



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**PŘÍPRAVA A EXPRESE IZOFOREM PROTEINU P53
POMOCÍ GATEWAY EXPRESNÍHO SYSTÉMU**

PREPARATION AND EXPRESSION OF P53 PROTEIN ISOFORMS USING THE GATEWAY EXPRESSION SYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Monika Wikarská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1379/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Monika Wikarská**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Příprava a exprese izoform proteinu p53 pomocí GATEWAY expresního systému

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše, GATEWAY klonování, izolace DNA a proteinů.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Monika Wikarská
student(ka)

doc. Mgr. Václav Brázda, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Produktom tumor-supresorového génu TP53 je proteín p53 a vďaka dvom promótorom a alternatívnemu zostrihu aj jeho 11 izoforiem skrátených z N- a/alebo C- terminálneho konca. Izoformy p53 sa nachádzajú v zdravom aj nádorovom tkanive a vo vzťahu k diagnostike, prognóze a liečbe rakoviny sú intenzívne študované. V tejto práci boli prostredníctvom LR reakcie Gateway systému klonovania pripravené expresné vektory kódujúce sekvencie izoforiem p53 určené na produkciu proteínov baktériami *E.coli* kmeňa BL-21. Na ich izoláciu afinitnou chromatografiou boli za rovnakým promótorom kódované spolu s dvoma fúznymi proteínmi, glutatión-S-transferázou a polyhistidínovou kotvou. Správnosť inzertov po homologúnej rekombinácii bola overená Sangerovou sekvenáciou. Výsledky sekvenácie potvrdili úspešné naklonovanie izoforiem p53 α , Δ 133p53 α , Δ 160p53 α , p53 γ a Δ 160p53 γ do expresného vektoru pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST. Proteín Δ 160p53 γ bol exprimovaný v bunkách BL-21 a izolovaný prostredníctvom oboch značiek. Izoláciou prostredníctvom polyhistidínovej kotvy bola získaná vyššia koncentrácia proteínu ako izoláciou sprostredkovanou interakciou glutatión-S-transferázy.

Abstract

The TP53 gene can express protein p53 and 11 another isoform proteins N- and/or C-terminally truncated by using two promoters and alternative splicing. The p53 isoforms are found in both healthy and tumorous tissues, and are intensively studied in relation to cancer diagnosis, prognosis and treatment. In this work, the p53 isoforms were subcloned into expression vectors by LR reaction adapted from Gateway cloning system. The expression vectors were designed for protein production by bacteria *E. coli* strain BL-21. The constructs containing p53 isoforms were encoded together with two fusion proteins, glutathione-S-transferase and polyhistidine tag under the control of the same promotor for the affinity chromatography protein isolation. All the clones underwent Sanger sequencing for verification after homologous recombination. Sequencing confirmed the accuracy of the subcloned isoforms p53 α , Δ 133p53 α , Δ 160p53 α , p53 γ and Δ 160p53 γ into an expression vector pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST. Protein Δ 160p53 γ was expressed in BL-21 and isolated using both HIS and GST tag interaction. Isolation using HIS tag yielded in a higher protein concentration then the isolation mediated by the interaction of the glutathione-S-transferase.

Kľúčové slová

proteín p53, izoformy p53, gateway klonovanie

Key words

protein p53, isoforms p53, gateway cloning

WIKARSKÁ, Monika. *Příprava a exprese izoforem proteinu p53 pomocí GATEWAY expresního systému*. Brno, 2019. Dostupné taky z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115255>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. 65 s. Vedoucí práce Václav Brázda.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému „Příprava a expresia izoforiem proteinu p53 pomocou GATEWAY expresního systému“ vypracovala samostatne a s použitím podkladov uvedených v zozname použitých zdrojov, ktoré som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

V Brne dňa 15.5.2019

.....
Monika Wikarská

Podakovanie

Za odborné vedenie a konzultácie ďakujem svojmu vedúcemu práce doc. Mgr. Václavovi Brázdovi, Ph.D.

Za podnetné pripomienky ku práci a psychickú podporu pri písaní ďakujem Honzovi, Klaudii a Adovi. Vďaku vyjadrujem aj svojej rodine, rodičom Monike a Milošovi za ich neustálu podporu nielen pri štúdiu, sestre Dagmar za zdieľanie prítomnosti a dobrého jedla, bratovi Martinovi za jeho objatia, teternici Zuzi za nakopnutie a motiváciu a babkám F. a W. za všetky myšlienky, ktoré mi venovali.

Na tomto mieste by som ešte vyjadrila pranie pre všetkých nasledujúcich študentov, obzvlášť pre tých, ktorí prichádzajú do výskumu s entuziazmom. Prajem vám, aby ste mali priestor kriticky myslieť a mal kto vaše myšlienky a prepojenia rozvíjať. Prajem vám, aby ste pracovali v podnetnom pracovnom tíme, v ktorom sa ľudia o všetko zaujímajú a tým posúvajú vpred seba aj výskum. Prajem vám dobre slúžiaci laboratórny systém, v ktorom technické zabezpečenie, metodika a organizácia je prednosťou vášho tímu a nie jeho slabinou a zdrojom zbytočných a drahých omylov. Prajem vám radosť pri písaní práce, ktorá vám dáva zmysel a ste presvedčení o jej dôležitosti v komplexe napredujúceho výskumu a jeho potenciálu. Prajem vám, aby ste sa nikdy necítili sami.

OBSAH

Abstrakt	3
Úvod	11
1 Teoretická časť	12
1.1 Proteín p53	12
1.1.1 Štruktúra génu TP53 a jeho funkčné domény	12
1.1.2 Rodina proteínov p53	13
1.1.3 Syntéza izoforiem p53	15
1.1.4 Funkcia p53	16
1.1.5 Regulácia p53	18
1.1.6 Tetramér p53 a jeho vzťah k DNA	19
1.1.7 TP53 a jeho vzťah k rakovine	21
1.2 Gateway klonovanie	24
1.2.1 Destinačný vektor pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST	26
1.3 Metódy	27
1.3.1 Izolácia DNA	27
1.3.2 Izolácia proteínov afinitnou chromatografiou	28
2 Experimentálna časť	31
2.1 Cieľ práce	31
2.2 Použitý materiál	32
2.2.1 Kity a kolóny	32
2.2.2 Enzýmy	32
2.2.3 Kultúry - kompetentné bunky	32
2.2.4 Plazmidy	32
2.2.5 Chemikálie	32
2.2.6 Prístroje	33
2.2.7 Ostatný materiál	34
2.2.8 Bioinformatické nástroje	34
2.2.9 Príprava médií, roztokov a pufrov	34
2.3 Metódy	35
2.3.1 Príprava chemicky kompetentných buniek	36
2.3.2 Transformácia plazmidovej DNA	36
2.3.3 Izolácia pDNA	36
2.3.4 Agarová elektroforéza	37
2.3.5 Gateway klonovanie - LR reakcia	38
2.3.6 Izolácia pDNA izoforiem p53 v pDEST15	40
2.3.7 Reštrikčné testy plazmidov	40
2.3.8 Sekvenácia DNA	40
2.3.9 Indukcia a izolácia proteínu	41

2.3.10	Analýza proteínov pomocou PAGE-SDS	42
3	Výsledky a diskusia	44
3.1	Izolácia ENTRY klonov	44
3.2	LR reakcia	44
3.3	Expresné vektory	46
3.3.1	Optimalizácia izolácie pDNA expresných vektorov	46
3.4	Analýza expresných vektorov	48
3.4.1	Reštrikčné testy	49
3.4.2	Overenie expresných vektorov sekvenáciou	50
3.5	Izolácia proteínu	51
4	Záver	53
5	Zoznam skratiek	61
6	Prílohy	63

ÚVOD

Jedným z najdôležitejších transkripčných faktorov podieľajúcich sa na ochrane bunky pred tumorigenézou je hlavný produkt génu TP53, proteín p53, ktorý patrí do rodiny proteínov p53 spolu s proteínmi p63 a p73 [1]. S rozdielnou afinitou sa viaže na responzívne elementy kanonických sekvencií DNA a nekanonické lokálne štruktúry DNA [2]. Medzi jeho tumor-supresorové funkcie patrí regulácia bunkového cyklu, iniciácia apoptózy a opravy DNA, poliferácia, starnutie bunky, diferenciácia a bunková migrácia. Dokáže však aj inhibovať samoobnovenie kmeňových buniek, modulovať autofágiu, preprogramovať diferencované bunky na kmeňové, či obmedziť inváziu a proces metastázy [3–6]. Signalizačné dráhy reguluje najčastejšie na úrovni transkripcie, môže však cieľiť aj na miRNA, niektoré mRNA a je schopný regulácie aj na základe interakcie s proteínmi [7, 8].

Gén TP53 je medzidruhovo štruktúrne konzervovaný a pozostáva z piatich domén. Každá z nich zohráva špecifickú úlohu v tvorbe aktívneho proteínu a iným spôsobom sa podieľa na jeho funkcii. V N-koncovej doméne sa nachádza transaktivačná doména dôležitá pre indukciu rôznych promótorov a interakciu s regulačnými proteínmi. V centrálnej oblasti sa nachádza DNA-väzbová doména interagujúca s DNA a regulačnými proteínmi. C-terminálny koniec zahŕňa oligomerizačnú doménu (nevyhnutnú pre vytvorenie transkripčne aktívneho tetraméru) a regulačnú doménu, ktorá je aj s OD dôležitá pre degradáciu proteínu, pretože je cieľovým miestom navedenia ubikvitínu [7, 9, 10].

Vďaka viacerým promótorom, alternatívnemu zostrihu a vnútornému miestu pre vstup ribozómu môže tento gén vytvárať 12 rôznych izoform proteínu, ktoré sú skrátené z N- a/alebo C-terminálneho konca. Izoformy p53 sa líšia sa v oblasti oligomerizačnej, transaktivačnej a C-terminálnej regulačnej domény, všetky obsahujú centrálnu DNA-väzbovú doménu a ich funkcia môže byť nezávislá od FLp53 [7, 9]. Izoformy p53 sú napriek svojej modifikácii biologicky funkčné proteíny prítomné v nádorových aj v zdravých tkanivách a ich zastúpenie závisí na konkrétnom type tkaniva [11, 12].

Izoformy p53 sú produkované v rôznych pomeroch špecifických pre konkrétne bunkového tkanivo [7]. Poškodenie regulácie ich expresie môže viesť k rôznym vážnym chorobám vrátane rakoviny. Identifikácia miery expresie izoform p53 v rakovinovom tkanive je zásadná pre predpoveď reakcie tela na konkrétny typ liečby a určenie celkovej prognózy pacienta [11]. Biologická aktivita izoform p53 je daná sumou všetkých ich aktivít v konkrétnom tkanive a dešifrovanie tohto „kódu izoform p53“ je predmetom početných výskumov [11, 13].

1. TEORETICKÁ ČASŤ

1.1 Proteín p53

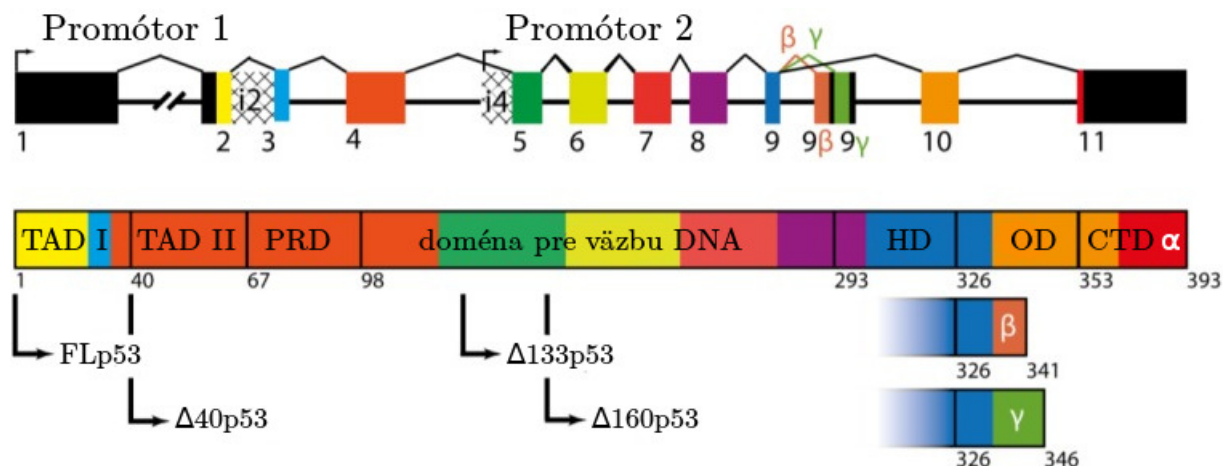
Proteín p53 je vďaka svojej-tumor supresorovej aktivite známy aj ako strážca genómu. Spolu s funkčne a regulačne podobnými proteínmi p63 a p73 tvoria rodinu p53 [1]. Jeho regulačná funkcia siaha až na genomickú úroveň, kde svojou väzbou na DNA dokáže napríklad zastaviť proliferáciu a bunkový cyklus bunky s poškodenou DNA a následne indukovať jej opravu alebo apoptózu. Proteín p53 bol objavený v roku 1979 ako onkogén, ale neskôr sa ukázalo, že vlastnosti onkogénu boli priradované jeho mutantnej forme. O tridsať rokov neskôr však bola jeho funkcia objasnená a p53 bol definitívne zaradený medzi nádorové supresory. Od jeho objavu až dodnes je proteín p53 intenzívne skúmaný hlavne vo vzťahu k rakovine, jej porozumení a liečbe [14]. Je hlavným produktom tumor-supresorového génu TP53 [15], ktorého mutácia spôsobuje viac ako 50 % zhubných nádorov [10]. Plne funkčný proteín FLp53 (z anglického „full-length p53”), ktorý interaguje s DNA ako tetramér, je iba jedným z dvanástich proteínov vznikajúcich z génu TP53 vďaka viacerým promótorom a alternatívnemu zostrihu. Funkcia týchto skrátených foriem, izoformiem p53, ešte nebola úplne objasnená, no vo všeobecnosti sú inhibítormi signálnych dráh p53. Vznikajú z génu TP53 a ich expresia nie je podmienená mutáciami tohto génu. Samotná mutácia génu tak nie je jediným predpokladom progresie rakoviny vo vzťahu k p53 [9].

1.1.1 Štruktúra génu TP53 a jeho funkčné domény

Rovnako ako ostatné transkripčné faktory, aj p53 má modulárnu štruktúru charakterizovanú prítomnosťou evolučne konzervovaných funkčných domén. Štruktúrne síce rozdeľujeme p53 na 3 oblasti, funkčne ale pozostáva z piatich domén (Obrázok 1.1). N- a C-koncové oblasti p53 (aminokyseliny 1-93 a 357-393) sú do značnej miery vnútorne neusporiadané [16].

V prvej oblasti, N-koncovej doméne, sa nachádza transaktivačná doména (TAD) a doména bohatá na prolín (PRD). Za ňou nasleduje centrálna DNA-väzbová doména (DBD) a tretou je C- koncová doména, ktorá obsahuje flexibilnú oblasť (HD, z anglického „hinge domain”), oligomerizačnú (tiež nazývanú tetramerizačnú) doménu (OD) a regulačnú doménu (CTD, z anglického „carboxyl terminus domain”) [9, 17, 18].

N-terminálny koniec FLp53 obsahuje dve transaktivačné domény TAD I a TAD II. Obe domény sú potrebné na indukciu rôznych promótorov a nie sú si ekvivalentné. Interagovať s množstvom rôznych proteínov a aktivovať transkripciu cieľových génov môžu obe domény nezávisle od seba [10] s vysokou špecifitou [19]. Jedným z dôležitých proteínov, ktorý interaguje s p53, je MDM2. Inhibuje funkciu p53 niekoľkými mechanizmami a každá z nich je založená na priamej interakcii [20] MDM2 a TAD/DBD časťami p53 [21].



Obr. 1.1: Gén TP53 a z neho exprimovaný proteín p53 so zobrazením vzniku jeho izoforiem.

Kanonicke exóny v géne TP53 sú označené farebne a alternatívne nepreložené regióny na 5' konci šrafovaním. Domény TAD I a II predstavujú transaktivačné domény, PRD doménu bohatú na prolín, DBD doménu pre väzbu na DNA, HD flexibilnú doménu, OD oligomerizačnú doménu a CTD C-terminálnu doménu.

Na obrázku je naznačený vznik alternatívnych verzií proteínu p53, o ktorých bude pojednávané viac v sekcii 1.1.3. Upravené a prevzaté z literatúry: [9]

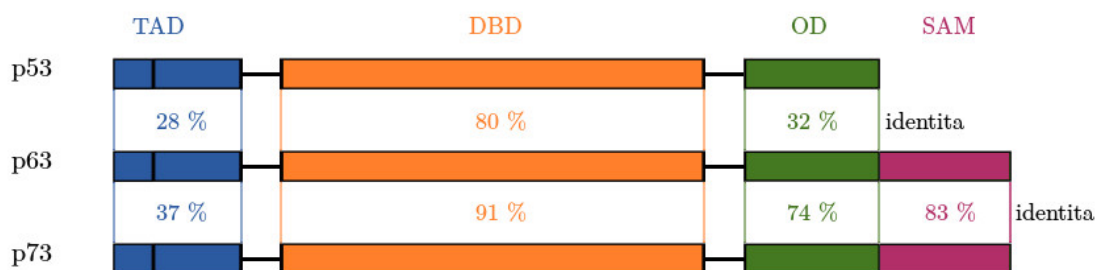
Tetramerizačná a C-terminálna doména nie sú jedinými doménami, s ktorými proteíny interagujú. Najviac proteínov komunikuje s centrálnou oblasťou p53 - DBD [9]. Medzi také patria proteíny ako napríklad Hsp90, Rad51, 53BP2 alebo BRCA2. Hsp90 katalyzuje skladanie proteínov na natívnu konformáciu, čím chráni ich funkciu v stresových podmienkach. Môže mať negatívny dopad na funkciu p53 stabilizáciou neaktívnych mutantov p53. Proteín Rad51 je súčasťou homolognej rekombinácie. Dokáže rozlíšiť poškodenú DNA, naviazať sa na jej konce a katalyzovať výmenu retazcov. Mechanizmom kontroly rekombinácie je interakcia p53 s Rad51 vedúca k inhibícii Rad51 [21].

DBD sa predovšetkým viaže na veľký žliabik DNA podľa modelu indukovaného prispôsobenia. Pri väzbe na DNA je dôležitá interakcia DBD a oligomerizačnej domény. OD vytvára helikálnu štruktúru, vďaka ktorej môžu vzniknúť diméry a následne pevne zbalené tetraméry p53. To umožňuje DBD naviazať sa na DNA a OD jej naviazanie stabilizuje svojou priestorovou štruktúrou [9]. Táto akcia je umožnená vďaka flexibilnej oblasti HD, ktorá sa nachádza medzi DBD a OD [18]. OD tiež obsahuje jadrový exportný signál NES, ktorý je v tetramére maskovaný a chráni tak p53 pred transportom do cytoplazmy, kde by génovú expresiu nemohol regulovať [9]. Druhou oblasťou C-terminálnej domény je regulačná oblasť, ktorá je aj s OD cieľovou štruktúrou pre ubikvitináciu [7].

1.1.2 Rodina proteínov p53

Proteín p53 patrí do rodiny zahŕňajúcej ďalšie dva príbuzné proteíny p63 a p73 [1], ktoré boli objavené približne 20 rokov po ňom [22]. Štruktúrne majú spoločné tri špecifické funkčné domény. Transaktivačnú doménu na NH₂ konci, sekvenčne špecifickú DNA - väzbovú doménu a oligomerizačnú doménu na COOH konci (Obrázok

1.2). DNA-väzbová doména je vysoko konzervatívna pre všetky proteíny rodiny p53 a vďaka štruktúrnej podobnosti proteínov sú všetky schopné viazať sa na p53 responzívne elementy [23] (responzívny element - RE - je krátka nukleotidová sekvencia, ktorá je súčasťou promótorov a zosilovačov transkripcie, rozoznávaná indukovateľnými transkripčnými faktormi [24]). C-terminálna časť je u proteínov p63 a p73 o niečo dlhšia ako u p53, navyše ešte obsahujú doménu SAM (z anglického „sterile alpha motif“) [3], ktorá je zahrnutá v proteínovej interakcii a podieľa sa na štruktúrnej stabilite proteínu [25]. Gény patriace do rodiny p53 sú navzájom sekvencne homologické, viažu sa na rovnaké konsenzuálne sekvencie DNA a inaktivujú tak rovnaké cieľové gény, čo by mohlo znamenať ich zameniteľnosť. Napriek tomu, mutantné myši, ktoré postrádali akúkoľvek kombináciu génov z rodiny p53, boli omnoho náchylnejšie na vznik rakoviny ako mutanty s poškodeným génom iba jedného z proteínov [26]. Na rozdiel od p53, proteíny p63 a p73 sú pri rakovine človeka mutované len zriedka a knockout génov kódujúcich p63 a p73 viedol skôr ku vývojovým defektom a nie ku rakovine, čo potvrdzuje, že ich funkcia nie je identická [17].



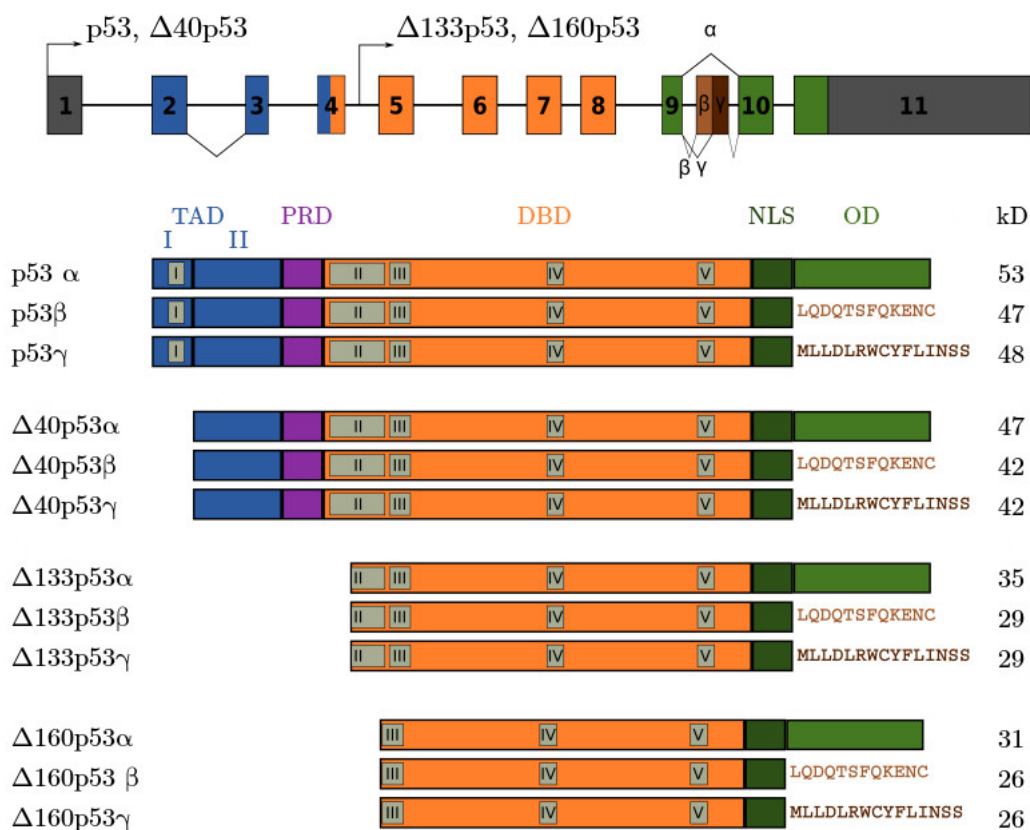
Obr. 1.2: Usporiadanie génov TP53, TP63 a TP73.

Všetky gény kódujú transaktivačnú doménu TAD, DNA-väzbovú doménu DBD a oligomerizačnú doménu OD. Sterilná alfa doména SAM sa nachádza iba v génoch TP63 a TP73. V percentách je zobrazená homológia jednotlivých domén génov. Pomer veľkostí jednotlivých domén neodpovedá skutočnosti. Upravené a prevzaté z literatúry: [13].

Všetky proteíny z tejto rodiny môžu existovať v rôznych izoformách [27]. Proteíny p63 a p73, rovnako ako p53, obsahujú alternatívne promótory lokalizované na treťom intróne a môžu podliehať alternatívnemu zostrihu na karboxylovom konci [28]. Alternatívnym zostrihom génov eukaryotických buniek, pri ktorom sa kombinujú rozdielne exóny za vzniku mRNA, je možné získať niekoľko izoform proteínu, ktoré sú kódované jedným génom. Viac ako 75 % génov cicavcov môže podliehať alternatívnemu zostrihu a pri približne 50% prípadov sa súčasne mení aj čítací rámec [29]. Teoreticky by mohlo byť z génu TP53 vytvorených aspoň 20 rôznych variant proteínov p53, gén TP63 by mohol vytvoriť aspoň 10 verzií proteínu p63 a produktom génu TP73 by teoreticky mohlo byť viac ako 40 izoform p73. Vznik všetkých však nebol potvrdený experimentálne [13]. Všetky proteíny z rodiny p53, preložené od prvého promótoru a zostrihnuté v plnej dĺžke) majú vo všeobecnosti rovnakú aktivitu v zmysle cieľových promótorov a biologických funkcií (nazývané aj FLp53 - „full length p53“ a Wtp53 - „wild type p53“ pokiaľ ide o proteín p53 v natívnej, nemutovanej forme). Medzi jednotlivými izoformami p53 sú väčšie funkčné rozdiely, majú častokrát antagonistickú aktivitu. Produkty alternatívneho zostrihu sa môžu stať transkripčne neaktívnymi a môžu byť navyše inhibítormi aktívnych proteínov rodiny p53 [28].

1.1.3 Syntéza izoforiem p53

TP53 je rozdelený medzi 11 exónov, u človeka je lokalizovaný na krátkom ramienku sedemnásteho chromozómu a kóduje vo viac ako 20 kbp proteín pozostávajúci z 393 aminokyselín [30]. Vďaka viacerým promótorom, alternatívnemu zostrihu a IRES (z anglického „internal ribosomal entry site vnútorné miesto pre vstup ribozómu, ktoré umožňuje nasadenie ribozómu, a teda spustenie translácie [31]), môže tento gén vytvárať až 12 rôznych izoforiem proteínu: p53(α , β , γ), $\Delta 133$ (α , β , γ), $\Delta 160$ (α , β , γ). Je zaujímavé, že všetky izoformy p53 obsahujú DBD, nevyhnutnú pre ich aktivitu a líšia sa v doménach TAD a CTD [7, 9].



Obr. 1.3: Ľudské izoformy proteínu p53.

Izoformy na C-terminálnom konci (α , β , γ) vznikajú alternatívnym zostrihom exónu 9. Ako α je označený transkript v plnej dĺžke C-terminálneho konca. Ďalšie dve verzie jeho skrátenia sú označené β a γ .

Šípkami sú zobrazené N-terminálne začiatky jednotlivých izoforiem. Poradie aminokyseliny, ktorou začínajú, odpovedá označeniu danej izoformy. Promótor P1 produkuje transkript, ktorý je možné preložiť nielen do FLp53, ale aj do $\Delta 40$ p53. Verzia $\Delta 40$ p53 vzniká vnútornou iniciáciou transkripcie vďaka intrónu 2 prítomnému v transkripte. Transkript $\Delta 133$ p53 iniciovaný promótorom P2 kóduje izoformy $\Delta 133$ p53 aj $\Delta 160$ p53. Upravené a prevzaté z literatúry: [32].

Izoformy skrátené z N-terminálneho konca

Izoformy $\Delta 40$ p53 postrádajú transaktivačnú doménu I, ostáva im však TAD II. Ich skrátenie je najmenšie zo všetkým izoforiem a môžu s FLp53 oligomerizovať *in vivo* a zastávať väčšinu funkcií FLp53. Vznikajú od promótoru P1, ktorý vďaka stop

kodónu terminuje transláciu krátko po začatí a vytvorí tým krátky peptid. Za stop kodónom však nasleduje IRES, ktoré re-iniciuje transláciu od kodónu 40 [34].

Na rozdiel od P1, promótor P2 nachádzajúci sa na intróne 4 produkuje mRNA s jediným otvoreným čítacím rámcom, ktorý kóduje skrútený proteín iniciovaný od kodónu 133. Jeho produkty preto nebudú obsahovať transaktivačné domény, prolinovú doménu, ani úplnú DBD [12], z ktorej im chýba prvý konzervovaný cysteínový box [35]. Transkript $\Delta 133p53$ kóduje tiež ďalšiu izoformu - $\Delta 160p53$ [32].

Izoformy skrútené z C-terminálneho konca

Výsledkom alternatívneho zostrihu exónu 9 sú izoformy skrútené zo strany C-terminálneho koncapomenované α , β a γ [15]. Exóny 5 a 7 obsahujú kazetu 7 párov báz, ktoré sú zosilovačmi alternatívneho zostrihu. Oligomerizačná doména je úplná len pri izoformách α , zatiaľčo pri β a γ izoformách je skrútená a nahradená desiatimi alebo pätnástimi zvyškami [27].

Kvôli prítomnosti dvoch promótorov P1 a P2 je proteín p53 označovaný ako duálny gén [9]. Duálna štruktúra génov je typická pre všetky proteíny z rodiny p53 a je jednotná medziodovo pre drozofily, danielo pruhované a človeka [33]. Alternatívny zostrih je však druhovo špecifický a regulovaný na úrovni transkripcie, post-transkripčných úprav a translácie [27].

Subcelulárna lokalizácia izoformami p53

FLp53 je všadeprítomný, izoformy p53 sú produkované v rôznych pomeroch špecifických pre konkrétne bunkového tkanivo[7]. V rámci bunky sa izoformy štandardne nachádzajú v rozdielnych subcelulárnych štruktúrach, čo môže tiež svedčiť o ich rozdielnej biologickej aktivite. Prostredníctvom imunofluorescenčných experimentov boli izoformy $\Delta 133p53\alpha$ a $p53\beta$ primárne lokalizované v jadre a v cytoplazme sa ich nachádzalo minimum. Izoforma $p53\gamma$ bola zase u niektorých buniek lokalizovaná v jadre, no pri iných bola dokázaná jej vysoká koncentrácia v cytoplazme, čo môže naznačovať reguláciu ich transportu medzi subcelulárnymi štruktúrami. Je zaujímavé, že sa $\Delta 133p53\beta$ a $\Delta 133p53\gamma$ líšia iba pätnástimi aminokyselinami na C-terminálnom konci, no $\Delta 133p53\gamma$ je prednostne lokalizovaná v cytoplazme na rozdiel od $\Delta 133p53\beta$, ktorej prítomnosť bola zaznamenaná v jadre. Toto zistenie môže indikovať zodpovednosť posledných 15 aminokyselín za lokalizáciu izoformami v rámci bunky [15].

1.1.4 Funkcia p53

Proteín p53 funguje mnohými spôsobmi. Najčastejšie reguluje transkripciu génov, môže však cieľiť aj na miRNA a niektoré mRNA. Okrem toho zastáva funkcie nezávislé od transkripcie, niektoré bunkové aktivity sú výsledkom jeho interakcií s ďalšími proteínmi [7, 8]. Prostredníctvom fosforylácie alebo acetylácie môže byť aktivovaný pri rôznych stresových podmienkach (chemické karcinogény, vírusové infekcie, radiácia) [7]. Vtedy sa začne akumulovať a stabilizovať [3].

Kanonické funkcie p53

Všeobecne známymi sú jeho tumor-supresorové funkcie. Medzi tieto kanonické funkcie patrí schopnosť zastaviť a znovu obnoviť bunkový cyklus, iniciácia opravy DNA a apoptózy, poliferácia a starnutie bunky, diferenciácia, či bunková migrácia. Tiež však ovplyvňuje post-apoptotické dráhy a bunkové procesy, napríklad moduláciu autofágie, dokáže inhibovať samoobnovenie kmeňových buniek, preprogramovať diferencované bunky na kmeňové, či obmedziť inváziu a proces metastázy [3–6].

Kanonická funkcia p53 je predovšetkým založená na podpore reparácie buniek s poškodenou DNA (ktorá by mohla viesť k abnormálnemu počtu chromozómov alebo aneuploidite) a zbavovaní sa buniek, ktoré nie je možné opraviť. Spôsobom zbavovania sa buniek môže byť spomínaná apoptóza, zastavenie bunkového cyklu, či starnutie bunky. Od týchto procesov častokrát závisí nádorová supresia, pretože predchádzajú akumulácii potenciálne zhubných alebo defektných buniek. Senescencia môže byť spustená stratou telomér, replikatívnym stresom alebo onkogénnou signalizáciou. Bunky podliehajúce senescencii vylučujú rôzne faktory, ktoré môžu podporovať odstránenie nádorových buniek vrodenným imunitným systémom. Na druhej strane môžu tiež podporovať tvorbu nádorov indukciou rastu [5].

p53 najprv koná v regulačnom uzle G1 fázy bunkového cyklu počas prechodu do S fázy a indukuje expresiu inhibítora Cdk (cyklín-dependentnej kinázy). Ten inaktivuje Cdk-G1/S komplex, ktorý blokuje pokračovanie cyklu a je zodpovedný za aktiváciu DNA-reparačného aparátu. Ak je poškodenie nenapraviteľné, p53 spustí apoptózu, ktorá zabezpečí, aby chybná DNA nebola prenesená na bunky potomstva. p53 blokuje angiogénu a tvorbu metastáz, na druhej strane však prostredníctvom súbežnej aktivácie rôznych signálnych dráh podporuje starnutie bunky [7]. Sieť interakcií však súvisí aj s ďalšími proteínmi rodiny p53 (p63 a p73) a ich izoformami. Lepšie porozumenie týchto vzťahov a ich regulácie môže viesť k ďalším pokrokom v liečbe rakoviny [13].

Nekanonické funkcie p53

Najnovšie sú predmetom štúdií aj s rakovinou nesúvisiace nekanonické funkcie p53 [5]. p53 ovplyvňuje rôzne bunkové metabolické procesy vrátane glykolýzy, oxidačnej fosforylácie a glutaminolýzy. Príkladom takej regulácie je serínová deprivácia, ktorej vplyvom sa aktivuje p53 a následne dráha syntézy serínu, vo veľkej miere potláčajúca aeróbnou glykolýzu [3].

p53 je schopný zachrániť bunku pred smrťou spôsobenou nedostatkom potravy aktiváciou metabolických procesov, autofágie a interakciami ovplyvňujúcimi metabolizmus živín. Vrámcou regulačných funkcií je p53 zahrnutý v metabolizme energie - inhibuje glykolýzu a podporuje dýchanie v mitochondriách. Jeho úloha v glukoneogenéze ešte nebola úplne objasnená. V súvislosti s p53 bol dokázaný nárast aj úbytok enzýmov nevyhnutných pre glukoneogénu. p53 navyše preberá aj funkciu pri regenerácii, vďaka čomu umožňuje údržbu tkanív a orgánov. Napriek tomu, že regenerácia patrí medzi nekanonické funkcie, úzko súvisí so všetkými kanonickými funkciami p53. Pri štúdiu drozofil bolo zistené, že bunky podliehajúce apoptóze sprostredkovanou p53 sekrétujú signálne molekuly, ktoré podporujú poliferáciu okolitých buniek. Umierajúce bunky tak môžu byť okamžite nahradené zdravými, čo zabezpečuje rýchle zotavenie tkaniva [5, 36].

Keď sa stretnú dve populácie buniek s rozdielnymi metabolickými a rastovými vlastnosťami, môže sa stať, že podľahnú javu nazývanému bunková kompetícia, kde jedna populácia začne expandovať na úkor druhej. Tento jav je homeostatický a slúži na podporu správnej funkcie a zdravia tkaniva elimináciou geneticky rozdielnych či suboptimálnych buniek. Regulácia bunkovej kompetície je sprostredkovaná aj proteínom p53. Pri konkrétnych podmienkach sa však môže stať patogénnym a viesť ku iniciácii rakoviny [5].

Funkcia p53 v iných subcelulárnych štruktúrach

Okrem jadra plní proteín p53 svoju regulačnú úlohu aj v mitochondriách a cytoplazme. Cytoplazmatický p53 interaguje s mnohými ďalšími proteínmi za účelom podporenia apoptózy či homologickej rekombinácie. Oproti jadrovému p53, ktorý sa chová ako spúšťač autofágie, cytoplazmatický ju môže naopak suprimovať. Mitochondriálny p53 slúži tejto bunkovej organelle ako strážca integrity a počtu kópií DNA. Pri oxidatívnom strese dochádza ku jeho akumulácii v mitochondriálnom matrix, čo môže viesť k nekróze. [3, 37].

1.1.5 Regulácia p53

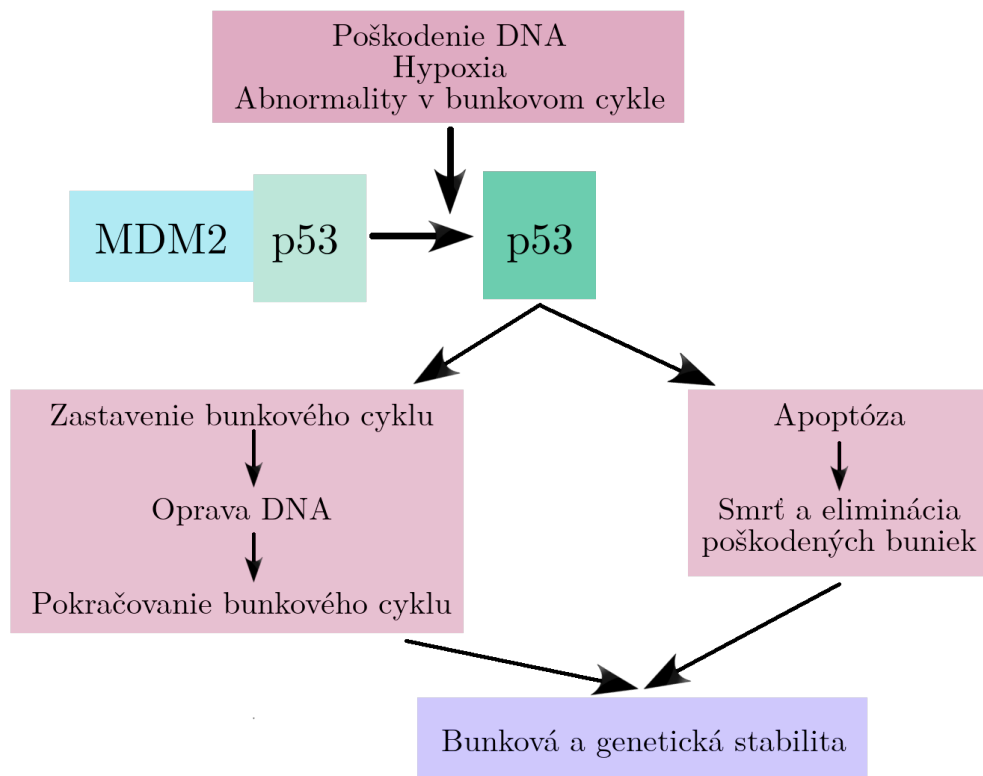
Proteín p53 je v zdravom tkanive udržiavaný vo veľmi nízkych koncentráciách [9]. Regulácia jeho funkcií je kontrolovaná niekoľkými mechanizmami: jeho transkripciou a transláciou, stabilizáciou proteínu, post-translačnými modifikáciami a subcelulárnou lokalizáciou [38]. Transkripcia približne 60 % génov je kontrolovaná pomocou miRNA, rovnako aj gén TP53 regulovaný týmto spôsobom už na genomickej úrovni. Proteín p53 podlieha autoregulácii - ako transkripčný faktor indukuje expresiu mnohých proteínov, ktoré sa následne stanú represormi transkripcie génu TP53 [7]. Stabilita, subcelulárna lokalizácia a transkripčná aktivita p53 je regulovaná aj ďalšími transkripčnými a post-transkripčnými procesmi ako fosforylácia, acetylácia, glykozylácia a sumoylácia [5]. Tieto modifikácie sa vyskytujú najmä v C- a N-terminálnom regióne a regulujú aktivitu p53 a tetramerizáciu [3].

Ubikvitín ligáza MDM2

Za normálnych rastových podmienok je funkcia p53 kontrolovaná regulovaním hladín proteínu p53 prostredníctvom kontinuálnej ubikvitinácie a degradácie, do značnej miery sprostredkovanej E3 ubikvitín ligázou MDM2 [8]. Vo fyziologických podmienkach cytoplazmy dochádza k rapidnej degradácii p53 sprostredkovanej proteínom MDM2 už po 5 až 20 minútach [27]. V nestimulovaných bunkách sa p53 nachádza v nízkych koncentráciách hlavne vďaka aktivite MDM2, ktorá podporuje export z jadra a degradáciu [9]. Expozícia buniek voči stresovým signálom ako je aktivácia onkogénu, oxidačný stres, skrátenie telomér a hypoxia môže pôsobenie MDM2 blokovat a viesť tak ku stabilizácii p53 [5, 8].

Samotná väzba p53 na kanonickú DNA sa nejaví ako regulovaná, no transkripčná odpoveď na jeho naviazanie môže byť ovplyvnená niekoľkými faktormi. Dej, ktorý nasleduje po aktivácii p53 závisí od povahy signálu, ktorý ho aktivoval a tiež od celkového kontextu podnetu vrámci bunky [8]. Bunkové procesy spustené funkciou p53 ako homotetramérneho transkripčného faktora závisia na hladine proteínu p53, jeho oligomerizačnom stave, dynamike indukcie, prítomnosti iných transkripčných

faktorov a koncentracii ďalších proteínov podieľajúcich sa na apoptóze. Tiež môžu byť závislé na prítomnosti a koncentrácii izoform p53, keďže niektoré z nich môžu mať antagonistickú aktivitu vo vzťahu ku FLp53 [39]. Regulácia p53 však začína už na genomickej úrovni. Rovnako ako u približne 60 % génov, transkripcia TP53 do mRNA je kontrolovaná pomocou miRNA [7].



Obr. 1.4: Regulácia p53 proteínom MDM2

Za normálnych podmienok je p53 inaktívovaný proteínom MDM2. V stresových podmienkach môže aktivovaný p53 plniť svoju funkciu vedúcu k bunkovej a genetickej stabilite. Upravené a prevzaté z literatúry [6].

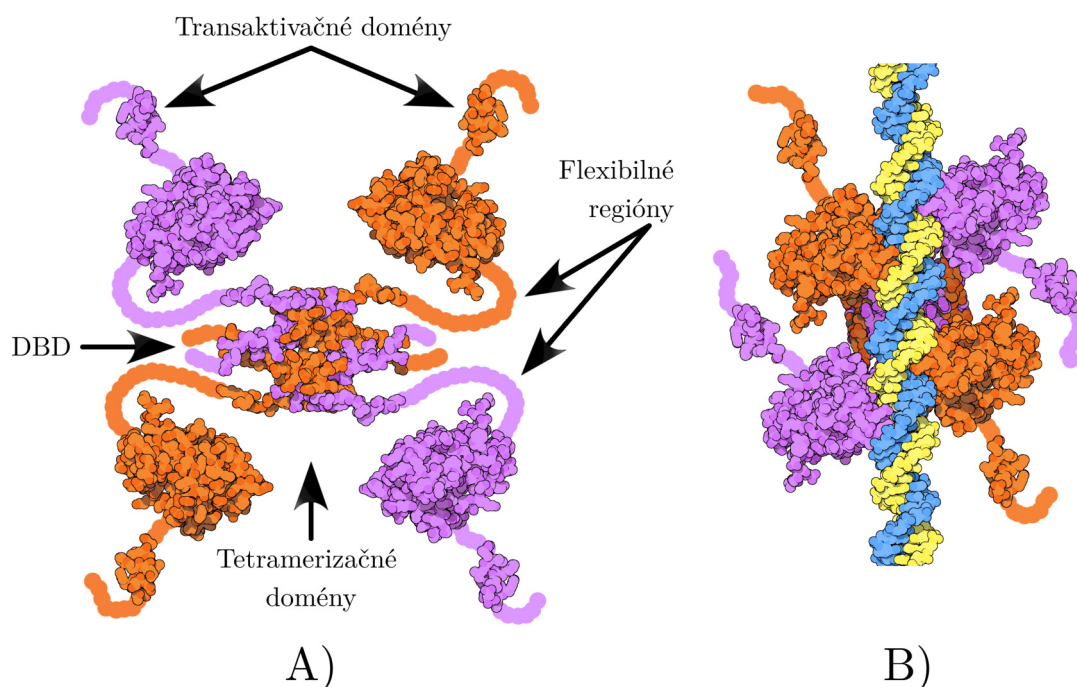
1.1.6 Tetramér p53 a jeho vzťah k DNA

Proteín p53 je schopný naviazať sa na špecifickú sekvenciu DNA zloženú z dvoch kópií sekvencie 50-Pu-Pu-Pu-C-(A/T)|(T/A)-G-Py-Py-Py-30, (kde Pu znamená puríne a Py pyrimidín) ktoré sú od seba vzdialené 0-13 párov báz. Túto konsenzuálnu oblasť DNA nazývame responzívny element (RE) [2, 9]. Väzbou na konsenzuálnu (kanonickú) DNA proteín p53 kontroluje expresiu cieľových génov buď aktiváciou alebo inhibíciou cieľových promótorov [2]. Pri poškodení DNA sa p53-diméry viažu na elementy reagujúce na p53, čím sa vytvorí dimér dimérov, ktorý iniciuje transkripciu génov citlivých na p53 a spúšťa dráhu p53 [9].

p53 vytvára tetramérny proteín, ktorý pozostáva zo štyroch spravidla identických jednotiek a slúži ako transkripčný faktor. Monoméry sú dimerizované, pripájajú sa na konsenzuálnu sekvenciu DNA a pri väzbe na konkrétny responzívny element vytvárajú štruktúru tetramérov [9] ako vidíme na obrázku 1.7. Vytvorenie tetramérnej

štruktúry je nevyhnutné pre špecifické naviazanie DNA, post-translačné modifikácie a proteín-proteínové interakcie. Tetramerizácia je sprostredkovaná doménou OD, ktorá alostericky reguluje naviazanie homotetraméru p53 na DNA. p53 responzívny element obsahuje štyri pentanukleotidové opakovania a každé z nich rozpoznáva jeden monomér tetraméru p53, čím sa jeho afinita k RE zvýši oproti samotnému monoméru až 100x [3]. V neprítomnosti DNA vytvára voľný tetramér krížovú štruktúru s voľne viazanými dimérmi interagujúcimi cez DBD. Naviazaný tetramér sa stáva rigidným a kompaktnejším [19].

Tetraméry však nie sú jedinou štruktúrou, ktorú p53 vytvárajú pripojením sa na DNA. Vzdialené tetraméry môžu interagovať medzi sebou, hromadiť sa a spôsobovať tak vinutie DNA [9].



Obr. 1.5: Tetramérna štruktúra proteínu p53.

A) Voľný proteín p53. Flexibilné časti p53 sú zobrazené len schématicky. B) Model p53 naviazaného na DNA. Upravené a prevzaté z literatúry[40].

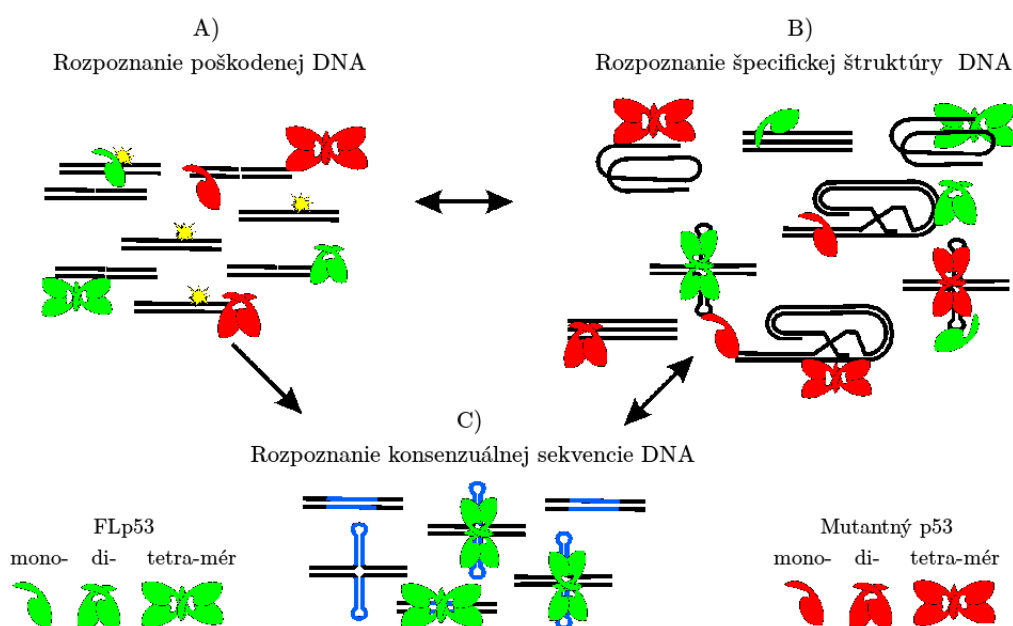
Afinita p53 k lokálnym štruktúram DNA

p53 svoju funkciu pri transkripcii, opravách, rekombinácii a replikácii DNA a dostupnosti chromatinu realizuje rôznymi spôsobmi interakcie s DNA [41]. Napriek tomu, že p53 spravidla uprednostňuje väzbu na superhelikálnu DNA, dokáže sa naviazať aj na nekanonické sekvencie. Môžu to byť chybné spárované duplexy, krížové štruktúry, ohyby DNA, štruktúrne flexibilná chromatinová DNA, hemikatenovaná DNA, troj- a štvorcestné spojenia, telomérické t-slučky [2] alebo aj CTG·CAG trinukleotidové opakovania [42]. Proteín p53 sa neviaže na všetky cieľové sekvencie rovnako ochotne, uprednostňuje ich na základe miery kompatibility štruktúry. Krížové štruktúry stabilizované negatívne stočeným superhelixom sú najpreferovanejšie cieľové miesta proteínu p53. Afinita p53 k cieľovej krížovej štruktúre DNA je úmerná miere negatívneho stočenia superhelikálnej DNA. Nielen primárna štruktúra DNA,

ale aj topologické podmienky sú dôležitým parametrom v rozpoznávaní proteínom p53. Nevyhnutnou podmienkou na vytvorenie krížovej štruktúry je vnútorná symetria DNA [2].

Proteíny p53 s mutáciou v oblasti DBD a afinitou k DNA môžu mať pozmenenú regulačnú funkciu a vo vzťahu k rakovine sú intenzívne študované.

Na rozdiel od WTP53, mutantný p53 sa na cieľové sekvencie neviaže vôbec, alebo len slabو. Čiastočnú funkciu môže získať heterodimerizáciou mutantných a natívnych p53, čím sa vytvorí dysfunkčný komplex. Mutantný p53 môže nadobudnúť aktivitu v dôsledku nerovnovážnej afinity WTP53 k RE a lokálnym štruktúram DNA. Lokálne trojrozmerné štruktúry sú nevyhnutné pre správne fungovanie bunky, pretože sú cieľovou oblasťou mnohých ďalších regulačných proteínov. p53 pravdepodobne pôsobí tiež ako faktor modulujúci topológiu DNA a táto úloha by mohla byť ďalšou dôležitosťou tohto proteínu pri prevencii rakoviny [18].



Obr. 1.6: Schéma vyjadrujúca afinitu mutantných a natívnych p53 k DNA vo forme mono- di- a tetra-mérov.

1.1.7 TP53 a jeho vzťah k rakovine

Viac ako 50 % zhubných nádorov je spôsobených mutáciou génu TP53 a viac ako 90 % bodových mutácií v TP53 sa nachádza v DNA-väzbovom mieste. Rapídne zvýšené podozrenie na rakovinu nemusí byť dané iba priamou mutáciou p53, ale aj inaktíváciou ktorejkoľvek z dráh regulovanej týmto proteínom [8, 10, 15]. p53 je vo vzťahu k rakovine študovaný už viac ako 40 rokov [8].

Úlohou dnešných výskumov je pochopiť princípy a mechanizmy tvorby izoformiem p53, ich molekulových interakcií a na základe toho identifikovať liečbu samotného dysfunkčného p53. Mnoho génov, ktoré sú regulované proteínom p53, rozhodujú o osude bunky. Pri inaktívácii p53 tak môžu bunky s poškodenou DNA prežiť, začať sa nekontrolovane deliť a spôsobiť rakovinu, v ktorej diagnostike aj liečbe má p53 tak prominentné postavenie [16].

Viac ako dve dekády bol študovaný vzťah proteínu p53 a jeho priameho inhibítora MDM2. Viedol k objavu niekoľkých malých neproteínových molekúl, ktoré ich interakciu inhibujú. Dnes sú už predmetom klinických štúdií ich úspešného využitia v liečbe rakoviny [20].

Mutácie p53

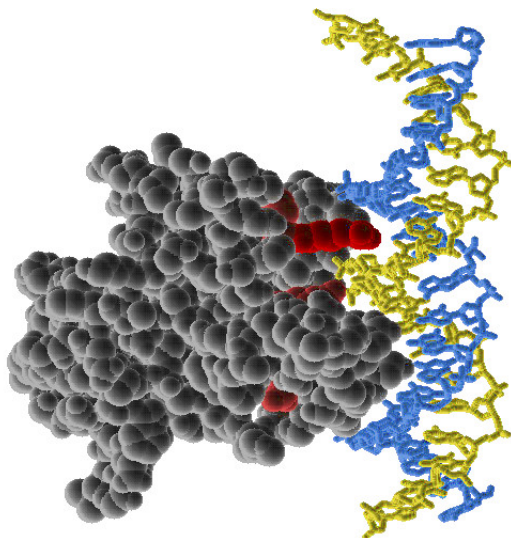
Mnohé inaktivované tumor-supresorové gény sú pri rakovine mutované deléciou alebo skrátením, na rozdiel od p53, pri ktorom bola väčšina mutácií v ľudskom karcinóme bodových. Mutácie p53 vedú k expresii proteínov p53 v plnej dĺžke so substitúciou jednej aminokyseliny a najčastejšie sa týkajú DNA-väzbovej domény nevyhnutnej pre väzbu WTP53 na svoje cieľové gény a funkciu [43].

Väčšina mutácií TP53 vedie ku vzniku vysokoexprimovaného mutantného proteínu. Okrem toho, že mutáciou p53 sa pravdepodobne jeho protinádorová funkcia stráca, aktívne sa môže podieľať na nádorovej progresii a zvyšovať rezistenciu voči protinádorovým liečbam [35] spôsobom dominantnej negatívnej regulácie natívneho p53 alebo nezávisle od neho [43]. Spôsoby inaktívácie p53 môžu byť rôzne, no najčastejšími sú mutácie DBD, ktoré spôsobia nekompatibilitu proteínu s cieľovými štruktúrami. [16]. Mutácie palindromických sekvencií, ktoré ovplyvňujú centrálny región, môžu mať obrovský vplyv na formáciu krížovej štruktúry [44]. Delécie a mutácie v oblasti OD môžu znížiť štruktúru tetraméru p53 a spätne eliminovať transkripčnú aktivitu. Prítomnosť mutovaného proteínu je vo vzťahu k rakovine pokladaná za dôležitejšiu než strata natívneho p53 [3]. So vznikom rakoviny sú dokonca spojené aj tiché mutácie v oblasti nekódovaných regiónov (intróny, reštrikčné oblasti, IRES), ktoré nevedú ku odlišnému fenotypu. Napriek tomu, že táto zmena genetického kódu vedie ku expresii natívneho p53, môže byť príčinou zmeny pôvodných pomerov vzniknutých izoforiem p53 [11].

Izoformy p53

Izoformy p53 sú fyziologicky aktívne proteíny, ktorých funkcia je úzko spojená s typom tkaniva, v ktorom sa nachádzajú [11]. Napriek tomu, že je väčšina izoforiem prítomná nielen v nádorových, ale aj v zdravých tkanivách, ich zastúpenie závisí na konkrétnom type tkaniva. Výnimkou je $\Delta 133p53\beta$, ktorý v zdravom tkanive úplne chýba [12]. Expresia izoforiem p53 je v niektorých typoch ľudských karcinómov dysregulovaná [4]. Poškodenie regulácie ich expresie môže viesť k rakovine, predčasnému starnutiu bunky, zápalom, embryonálnej malformácii a (neuro)degeneratívnym chorobám [11]. Odpoveď bunky na aktivitu izoforiem nie je určená aktivitami jednotlivých proteínov, ale sumou všetkých ich aktivít v konkrétnom tkanive. Na základe identifikácie expresie izoforiem p53 a kontroly mutácií génu TP53 v rakovinovom tkanive je možné určiť prognózu pacienta a presnejšie predpovedať reakcie tela na konkrétny typ liečby. Vplyvy a zmeny regulácií jednotlivých izoforiem p53 sú konzistentné vo všetkých organizmoch obsahujúcich ich homológne verzie, (drozofila, daniel pruhovalý, myši) preto je možné študovať ľudský TP53 aj na týchto modeloch [11].

Ukázalo sa, že pri transfekcii FLp53 a p53 β sa apoptóza sprostredkovaná proteínom p53 zvýšila a v prítomnosti FLp53 a $\Delta 133p53$ bola inhibovaná v miere, ktorá závisela od koncentrácie $\Delta 133p53$. To môže znamenať, že aktivita FLp53 je modulovaná prítomnosťou izoforiem p53 a regulácia v zdravom aj nádorovom tkanive človeka je komplexná. Každá izoforma p53 môže mať navyše špecifické biologické



Obr. 1.7: Kľúčové miesta najbežnejších mutácií p53 v oblasti DBD.

Hadovitý výbežok zobrazený červenou farbou predstavuje arginín 248, ktorého štruktúra zapadajúca do malého žliabiku DNA vytvára silnú stabilizáciu interakcie. Zámenou arginínu sa táto interakcia stráca. Svetlejšou červenou sú označené aminokyseliny kľúčové pre naviazanie na DNA alebo stabilizáciu aminokyselín, ktoré sa aktívne podieľajú na väzbe [40].

funkcie nezávislé na FLp53, čo by mohlo byť dôvodom jeho angažovanosti v toľkých biologických procesoch [45].

V mnohých štúdiách bolo preukázané, že prognóza spojená s mutovaným p53 bola lepšia v kombinácii s expresiou izoformiem p53 [11]. Pacienti s mutovaným p53 mali veľmi nízku šancu na prežitie, na rozdiel od tých, ktorí súčasne s mutovaným p53 exprimovali aj izoformu p53 γ . Tí mali celkovo nižšiu pravdepodobnosť návratu rakoviny a prežitie bolo porovnateľné ako u pacientov s WTp53 [46]. Pacientky s mucinóznym alebo seróznym karcinómom vaječníkov dosiahli lepší klinický výsledok ak okrem FLp53 ich tkanivo produkovalo aj izoformu $\Delta 40p53\alpha$. Pacientky s rakovinou vaječníkov a mutovaným p53 majú vyššiu šancu na vyliečenie a celkové prežitie pri súčasnej produkcii $\Delta 133p53\alpha$ [11].

$\Delta 40p53\alpha$ má zníženú schopnosť aktivovať transkripciu cieľových génov p53, ale môže tvoriť komplexy s FLp53 a tak pozitívne alebo negatívne modulovať expresiu p53-dependentných génov [4]. Transgénna expresia izoformy $\Delta 40p53$ nevedie u myší ku tvorbe nádorov, ale je spojená s krátkou životnosťou, poklesom kognitívnych funkcií a diabetom [13].

Posledné štúdiá ukázali, že izoformy $\Delta 133p53$ môžu zohrávať rolu onkogénu. Pri pokusoch na myšiach s nadmernou expresiou izoformy $\Delta 122p53$, ktorá je homologická ku $\Delta 133p53$, bola pozorovaná nižšia apoptotická aktivita, zvýšená polliferácia a vznik širokého spektra maligných a benigných nádorov. Zvýšená expresia týchto izoformiem bola pozorovaná pri rakovine prsníka a obličkových buniek. V zdravom tkanive však nebola detekovateľná vôbec, alebo vo veľmi nízkych koncentráciách. Progresia adenómu hrubého čreva do karcinómu je sprevádzaná zvýšením mRNA $\Delta 133p53$. Úroveň expresie $\Delta 133p53$ je spojená so stavom mutácie p53. Pozoruhodné je, že nádory hrubého čreva exprimujúce WTp53 mali vyššie hladiny $\Delta 133p53$ ako

nádory s p53 mutantným p53. Nie všetky rakovinové nádory nadmerne exprimujú $\Delta 133p53$. Napríklad pri spinocelulárnom karcinóme hlavy a krku neboli nájdené signifikantné zmeny v hladinách $\Delta 133p53$, čo naznačuje, že táto izoforma plní svoju onkogénnu funkciu v závislosti na konkrétnom type tkaniva [13].

p53 β bola v rakovinových tkanivách významne zvýšená a jej koncentrácia bola spojená so štádiom nádoru [47]. Nadmerne exprimovaný p53 β bol spojený s progresiou nádoru v karcinóme obličkových buniek a bol pozorovaný aj vo väčšine melanómových bunkových línii [13].

Napriek početným výskumom zameraným na mnoho aspektov týkajúcich sa izoforiem p53 je ich funkcia a regulácia ešte veľmi málo pochopená [13]. Miera expresie jednotlivých izoforiem je nevyhnutná pre predpoveď osudu bunky, preto dešifrovanie ich kombinácií (kódu izoforiem p53) poskytuje fascinujúce a veľmi dôležité pohľady na liečbu rakoviny, degeneratívnych chorôb a starnutie. Dešifrovanie kódu izoforiem p53 sa môže zdať nemožné kvôli ich veľkému počtu a posttranslačným modifikáciám, ale izoformy sú väčšinou exprimované súčasne v konkrétnych kombináciách a zriedka všetky naraz. Niektoré izoformy sa vzájomne vylučujú, zatiaľ čo iné sú vždy koexprimované tak, že počet kombinácií izoforiem p53 je obmedzený. Získanie kódu izoforiem p53 je nevyhnutnou súčasťou predpovede reakcie tkaniva na konkrétny typ liečby rakoviny [11].

1.2 Gateway klonovanie

Gateway spôsob klonovania patrí s klonovacími systémami Creator a Echo cloning medzi rekombinačné klonovanie. Je založené na prenose fragmentu z jedného vektora do druhého bez použitia reštrikčných enzýmov a ligáz [48]. Gateway klonovanie umožňuje rýchly transfer požadovaného génu do multivektorového systému kvasiniek, bakulovírusov a buniek cicavcov [49].

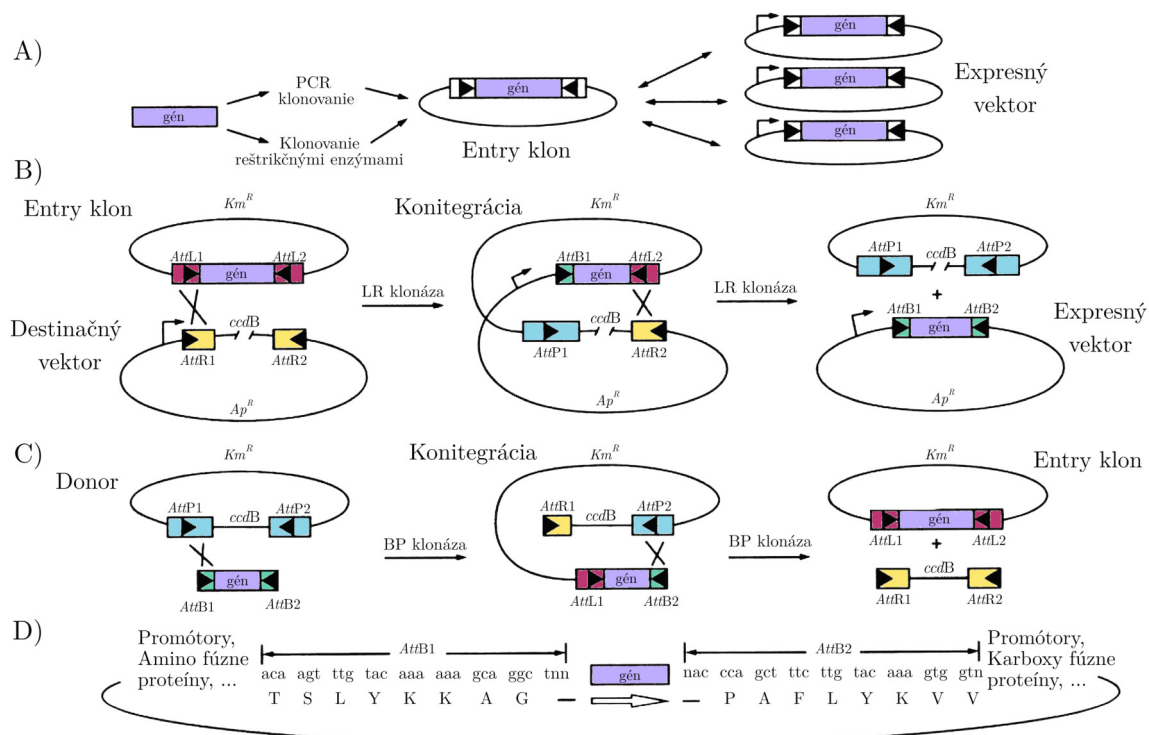
Táto miestne špecifická rekombinácia je prevzatá zo systému baktériofága λ . Jeho životný cyklus pozostáva z dvoch dráh - lytickej a lyzogénnej. Ako lytický fág rozkladá bunku za uvoľnenia novovzniknutých vírusov. Alternatívne sa však môže rekombináciou konkrétnych sekvencií integrovať do genómu *E. coli* procesom zvaným lyzogenia. Tá sa vyznačuje vysokou špecifitou rekombinácie iba medzi sekvenciami *att* a konzervatívnosťou (nedochádza ku strate ani získaniu nukleotidov) [50].

Na princípe špecifickej rekombinácie baktériofága λ sa zakladá systém Gateway klonovania. Pozostáva z dvoch reakcií. Prvá, integračná reakcia, je pôvodne lyzogénna a je sprostredkovaná integrázou (*Int*) a integračným hostiteľským faktorom (IHF). V systéme Gateway je označovaná ako BP reakcia. Druhá, LR reakcia, je sprostredkovaná *Int*, IHF a excisionázou (*Xis*).

1. BP reakcia: $attB \times attP \rightarrow attL + attR$
2. LR reakcia: $attL \times attR \rightarrow attB + attP$

Smer reakcie je preto možné jednoducho ovplyvniť prítomnosťou enzýmu *Xis* a rekombinovanými sekvenciami *Att*. Keďže *AttB1* sa dokáže rekombinovať s *AttP1*, ale nie s *AttP2*, správna orientácia génov je zaistená už počas rekombinácie. Celý princíp oboch reakcií je zobrazený na obrázku 1.8.

Do LR reakcie vstupujú dve DNA: Entry klon nesúci prenášaný segment DNA (*AttL1*-gén-*AttL2*) a cieľový - DEST vektor, do ktorého má byť segment DNA prenesený (*AttR1*-*ccdB*-*AttR2*). Po inkubácii týchto dvoch DNA s rekombinantnými



Obr. 1.8: Schéma základného princípu klonovania Gateway systémom [51].

Trojuholníky reprezentujú homológne sekvencie, ktoré podliehajú rekombinácii. A) Gény sú klonované do Entry vektorov pomocou *in vitro* rekombinácie PCR produktov alebo pomocou reštrikčných enzýmov a ligázy. Ďalej sú už gény klonované iba rekombináciou. B) Subklonovanie génu z Entry vektora do DEST. C) Klonovanie *attB*-PCR produktov pomocou *in vivo* rekombinácie. D) Sekvencie *attB1* a *attB2* lemujúce gén vzniknutý ako produkt PCR pomocou primerov obsahujúcich *attB* sekvencie alebo expresný vektor.

proteínmi *Int*, *Xis* a *IHF* vzniká najprv kointegrovaná molekula, ktorá je následne rozdelená za vzniku cieľového vektora obsahujúceho klonovaný DNA segment a vedľajšieho produktu. Aby boli po transformácii získané iba klony obsahujúce expresný vektor, bol zavedený systém dvoch selekčných schém. Prvá selekčná schéma je založená na rozdielnej rezistencii Entry a DEST klonu. Entry klon nesie rezistenciu voči kanamycínu (*Km^R*) a DEST voči ampicilínu (*Ap^R*). Selekcia expresných vektorov na ampicilín teda zabráni rastu Entry klonov, ktoré nepodľahli rekombinácii. Druhá selekčná schéma je za účelom odstránenia vedľajšieho produktu tejto reakcie a vstupujúceho destinačného vektora, ktorý nepodľahol rekombinácii. Vektor, ktorý vznikol ako vedľajší produkt, po rekombinácii obsahuje selekčný marker - gén *ccdB*, prenesený z jeho pôvodného nositeľa DEST. Selektívny marker *ccdB* inhibuje rast hostiteľskej *E. coli*, preto bunky nesúce vektory vedľajšieho produktu rekombinácie neprežijú [50–52].

Destinačný vektor je potrebné kultivovať v bunkách, ktoré obsahujú antitoxín *ccdA*. Gén *ccdB* kóduje toxický proteín jedovatý pre DNA-gyrázu, ktorá sa jeho vplyvom uzamkne v otvorenej dvojštrúbicovej DNA [53]. DNA-gyráza katalyzuje ATP-dependentné negatívne točenie dvojštrúbicovej uzavretej kruhovej DNA [54]. Kompetentné bunky *ccdB* SurvivalTM sú voči tomuto toxínu imúnne, pretože exprimujú gén *ccdA*, ktorý je voči nebu antitoxínom. Oba sú kódované v *E. coli* génom *ccd*, ktorý je zodpovedný za reguláciu bunkového delenia [53].

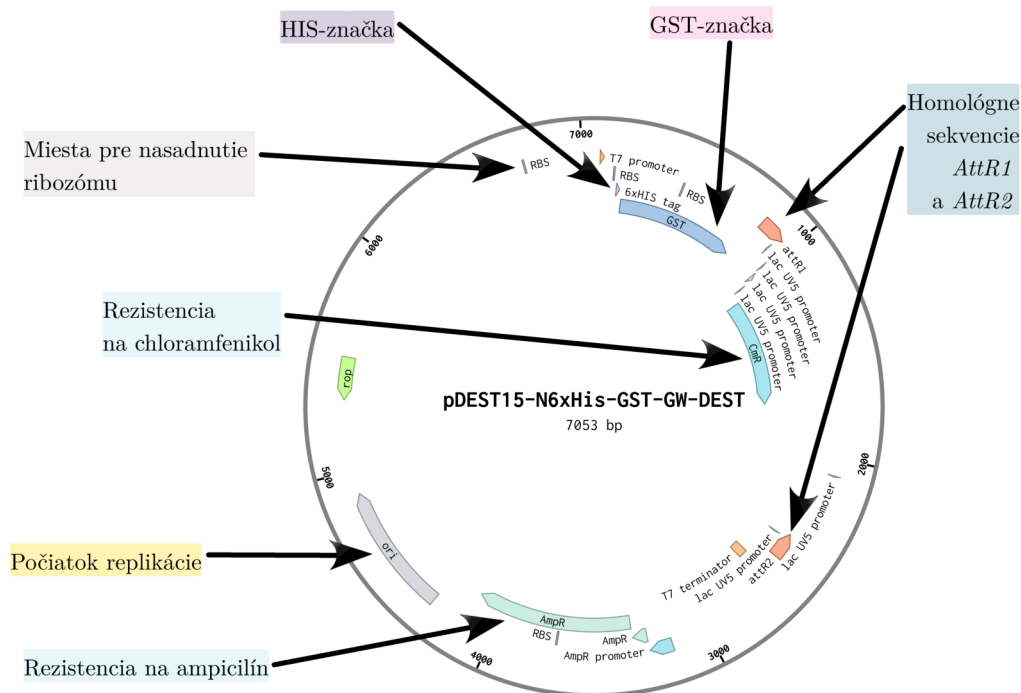
BP reakcia je dôležitá najmä pre tvorbu Entry klonov obsahujúcich produkty PCR. Tie musia byť amplifikované primermi, ktoré obsahujú terminálne *attB* sekvencie. Takto pripravené Entry klony môžu okamžite vstúpiť do LR reakcie za vzniku expresného klonu.

Expresné klony dokážu exprimovať buď natívne, alebo fúzne proteíny. Natívne proteíny sú spolu aj s ich štartovacím a stop kodónom ohraničené rekombinačnými sekvenciami *attB*. Výsledkom translácie je proteín s nepreloženým regiónom mRNA na 5' konci. Ak je však za promótorom kódovaný fúzny proteín na N-terminálnom konci, medzi fúzovanou doménou a kódovaným proteínom sa bude nachádzať sekvencia *attB1* dlhá 25 bp preložená do deviatich aminokyselín. C-terminálne fúzne proteíny by obsahovali rovnako dlhú časť kódovanú *attB2* medzi génom a C-terminálnou fúzovanou časťou [50].

Pri selekcii na ampicilín je možné v okolí rezistentných transformantov pozorovať drobné satelitné kolónie. Tieto kolónie nie sú rezistentné voči ampicilínu, napriek tomu sú však schopné rasti na Petriho miske, aj keď obmedzene. Mechanizmus rezistencie voči ampicilínu je totiž založený na produkcii extracelulárneho enzýmu produkovaného rezistentnými kolóniami. Enzým je vylučovaný do svojho okolia, aby inaktivoval antibiotikum a rezistentné bunky mohli prežiť. Zníženie koncentrácie antibiotika v okolí transformanta dáva neskôr možnosť rasti kolóniám, ktoré voči ampicilínu rezistenciu nenesú. Tieto satelitné kolónie začnú sú oproti transformantom veľmi malé a neobsahujú klonovaný gén [55, 56].

1.2.1 Destinačný vektor pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST

Destinačný vektor pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST bol vytvorený z pôvodného vektoru od ThermoFisher Scientific pDEST15 (pre zjednodušenie je v tejto práci aj napriek jeho modifikácii označovaný ako pDEST15.) Obsahuje IPTG - inducibilný promótor T7, ktorý sa vyznačuje vysokou úrovňou transkripcie. Je preto vhodný pre nadprodukcii proteínu, ktorý je kódovaný za ním. Tento promótor nie je rozpoznávaný RNA polymerázami nachádzajúcimi sa v *E. coli*, preto je nezávislý na regulácii promóterov *E. coli*. Frekvencia jeho transkripcie môže byť taká vysoká, že tok nukleotidov dokáže nasmerovať len na svoju transkripciu, čím znemožňuje bunkám syntetizovať ani RNA nevyhnutné pre ich prežitie. Preto je nevyhnutné jeho transkripciu regulovať [57]. Jedine T7 RNA polymeráza je schopná prepisu génu pod týmto promótorom. Syntéza samotnej T7 RNA polymerázy je pozitívne aj negatívne regulovaná. L-arabinóza jej expresiu indukuje - po vytvorení komplexu s transkripčným regulátorom AraC dá priebeh sledu udalostí, ktoré vedú ku transkripcii T7 RNA polymerázy. Jej bazálna hladina je prepisovaná v prítomnosti aktivačného proteínu CAP, ktorý je schopný naviazať sa na DNA ako komplex cAMP-CAP. Znížením hladiny cAMP jednoduchým dodaním glukózy do média môže dôjsť ku represii, čím sa transkripčná aktivita T7 RNA polymerázy zníži. Pre expresiu rekombinantných proteínov týmto systémom je vhodný kmeň BL-21 práve preto, že obsahuje spomínanú T7 RNAP kazetu regulovanú *araBAD* promótorom [58].



Obr. 1.9: Popis sekvencií, ktoré sa nachádzajú v destinačnom vektore pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST.

Vytvorené v programe Benchling zo sekvencie voľne dostupnej vo vektorovej databáze Addgene.

1.3 Metódy

1.3.1 Izolácia DNA

Izolácia plazmidovej DNA pre produkciu proteínov a klonovanie pozostáva z dvoch krokov. Prvým je bakteriálna lýza a druhým izolácia pDNA. Alkalická lýza je efektívnym spôsobom ako odseparovať plazmidovú DNA od genomickej. Pre separáciu DNA od ostatných molekúl po lýze sa štandardne používa silikagélových patrón. Izolácia je založená na schopnosti chaotropických solí dehydrovať DNA, čo jej poskytuje možnosť reverzibilne sa naviazať na silikagél cez fosfátové skupiny. Alkohol (etanol, izopropanol) takisto podporujú DNA v naviazaní sa na silikagélovú vrstvu, pretože zvyšuje ich vzájomnú interakciu. Alkohol však navyše DNA precipituje a tá sa zachytáva v silikagélovej vrstve, ktorá tak slúži aj ako filter. Výťažok DNA je limitovaný veľkosťou patrónu, keďže silikagél môže naviazať iba obmedzené množstvo pDNA. Bolo však dokázané, že po pridaní etanolu k lyzátu nie je zachytené množstvo DNA limitované silikagélovou náplňou. Vplyvom etanolu sa DNA precipituje a zachytí sa v patrónu, ktorá sa vtedy správa ako filter. Ďalšími dôležitými parametrami pri izolácii DNA sú veľkosť a typ plazmidu, frekvencia kopírovania plazmidu, rastové podmienky bakteriálneho kmeňa, alebo typ kmeňa [59].

Koncentráciu DNA je možné merať spektrofotometricky. Maximum absorbancie DNA a RNA je pri 260 nm a proteínov pri 280 nm. Aj proteíny aj nukleové kyseliny však absorbujú pri oboch hodnotách, preto spektrometricky zistená koncentrácia môže byť v oboch prípadoch skresľujúca. Na overenie čistoty sa preto sleduje pomer

absorbancií pri 260 a 280 nm - pomer 260/280. Hodnota pomeru je rôzna pre každý typ nukleotidu a preto sa môže meniť v závislosti od vzorky DNA. Hodnoty 260/280 pre jednotlivé nukleotidy sú: guanín - 1,15; adenín - 4,50; cytozín - 1,51; uracil - 4,00 a tymín - 1,47. Výsledná hodnota pre konkrétnu nukleovú kyselinu je približne rovná váženému priemeru prítomných štyroch nukleotidov. Každá DNA bude mať preto mierne odlišný pomer 260/280, charakterizujúci jej proteínovú alebo DNA čistotu. Štatisticky, podľa zastúpení jednotlivých nukleotidov v DNA, je za čistú považovaná DNA s pomerom 260/280 rovným 1,8 [60] a akceptovateľné hodnoty sú v rozmedzí 1,75-1,95 [59]. Za čistú RNA je zase považovaná vzorka s 260/280 okolo 2. RNA absorbuje viac kvôli vyššiemu pomeru 260/280 uracilu v porovnaní s tymínom. Pomer nižší ako 1,7 indikuje proteínové znečistenie a vyšší ako 1,9 znečistenie RNA [60]. RNáza, ktorá je pridávaná pri lýze baktérií, môže časom strácať na svojej účinnosti. To môže znamenať, že staršie lyzačné roztoky môžu pri meraní OD₂₆₀ výťažky falošne zvýšiť kvôli čiastočnej kontaminácii preparátu RNA - nameraná hodnota tak nemusí korešpondovať so skutočnou koncentráciou DNA [59].

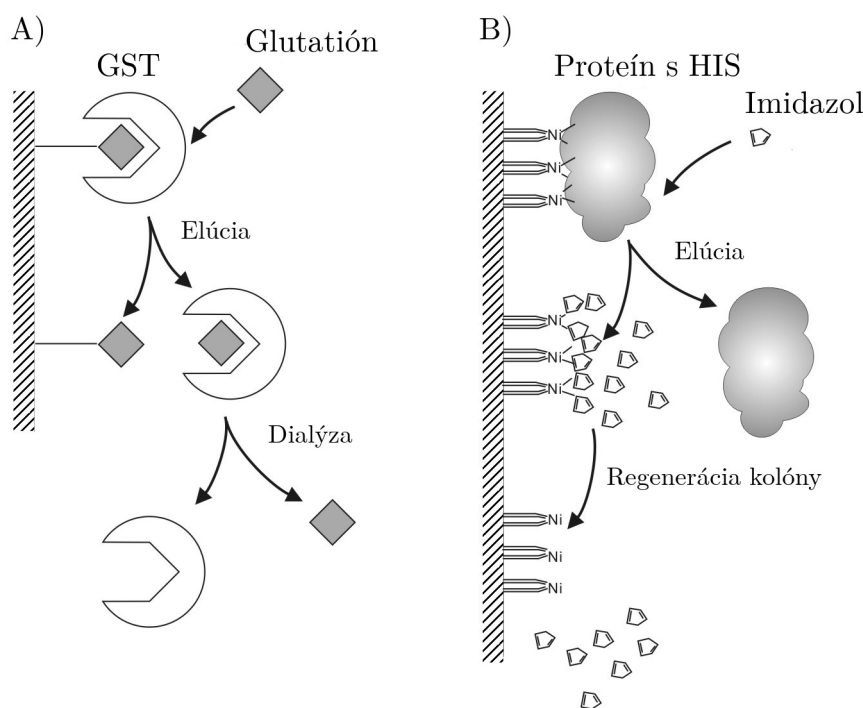
Plazmidová DNA môže existovať vo viacerých konformáciách: superhelikálnej kruhovej (ccc-DNA), otvorenej kruhovej (oc-DNA) a lineárnej (l-DNA). Na to, aby sa zmestila do jadra, je *in vivo* zvinutá v superhelikálnej štruktúre. Veľká časť laboratórne pripravenej pDNA je tiež superhelikálna, ale konkrétne množstvo sa nachádza aj ako oc-DNA. Tej dáva agarózový gél väčší odpor ako veľkej otvorenej oc-DNA, preto superhelikálna ccc-DNA putuje gélom rýchlejšie ako otvorená kruhová. Lineárna l-DNA putuje gélom trochu pomalšie ako superhelikálna. Existujú aj ďalšie štruktúry DNA ako diméry, multiméry, ktoré môžu putovať gélom vďaka svojej násobnej veľkosti omnoho pomalšie. Akonáhle je však pDNA linearizovaná reštrikčnou endonukleázou, všetky vyššie štruktúry sú zrušené a na géli poskytuje iba jeden bend. Keďže DNA rebríčky poskytujú informáciu o veľkosti lineárnej DNA, zlinearizovaný plazmid je jediná štruktúra pDNA, ktorej veľkosť je možné určiť porovnaním s polohou známych bendov DNA-rebríčka [61].

1.3.2 Izolácia proteínov afinitnou chromatografiou

Purifikácia rekombinantných proteínov je základom pre štúdium ich funkcie a štruktúry. Štandardne sú rekombinované proteíny exprimované s afinitným značením (tagom), ktorý je fúzovaný na N- alebo C- terminálnom konci a uľahčuje purifikáciu a detekciu proteínu [62]. Afinitná chromatografia je metóda purifikácie špecifických molekúl z komplexných zmesí. Je založená na biologických interakciách medzi dvoma molekulami ako napríklad interakcia enzýmu a substrátu, receptoru a ligandu alebo antigénu a protilátky. Tieto typicky reverzibilné interakcie sú veľmi vhodné práve na purifikáciu proteínov. Jedna z dvojice molekúl je imobilizovaná v pevnej matrici, kde tvorí stacionárnu fázu. Druhá z dvojice je súčasťou cieľovej - purifikovanej molekuly a nachádza sa v mobilnej fáze. Pri prechode stacionárnou je na základe ich afinity zadržovaná. Po jej zadržaní zväčša nasledujú purifikačné kroky a nakoniec elúcia vysokočistého rekombinantného proteínu [63].

Biologická funkcia proteínu je determinovaná jeho kvartérnou štruktúrou, ku tvorbe ktorej dochádza po translácii procesom nazývaným skladanie proteínov [64]. Mnohé eukaryotické proteíny sú vyrábané bakteriálnymi bunkami. Rýchlosť biosyntézy proteínov v prokaryotoch je asi desaťkrát rýchlejšia ako u eukaryotov a rýchlosť predĺžovania polypeptidových reťazcov koreluje s mierou skladania proteínov. Preto

pri expresii eukaryotických proteínov v baktériách môže kombinácia rýchlej syntézy a pomalého skladania podporovať proteínovú agregáciu a viesť ku vzniku nerozpustných proteínov nazývaných bunkové (proteínové) inklúzie. Expresia proteínov vo forme inklúzií je výhodná v tom, že rekombinantný proteín nepodlieha proteolýze a umožňuje bunke akumulovať aj produkt, ktorý by bol pre ňu inak toxický. Navyše sú proteíny vo forme inklúzií schopné sedimentovať a na základe tejto fyzikálnej vlastnosti je možné ich jednoducho purifikovať. Nevýhodou neskôr je, že na znovuoobnovenie funkcie bunkovej inklúzie musí byť proteín prevedený do natívnej konformácie spätným zbalením, ktoré je dosiahnuteľné zväčša len pri menších proteínoch a od veľkosti 40-70 kDa je prinavrátenie ich aktivity takmer neuskutočniteľné. Rozpustné proteíny majú síce svoju aktivitu jednoduchšie zachovateľnú, no ich purifikácia je náročnejšia. Keďže sú veľmi náchylné na proteolýzu, bolo vyvinutých niekoľko spôsobov ako proteolýze predísť. Jedným z riešení je zmena rastových podmienok (najčastejšie času indukcie pre indukibilné promotory), takisto je možné zvoliť hostiteľský kmeň postrádajúci proteázy, alebo ochrániť cieľový proteín prídavkom inhibítora proteáz. [49].



Obr. 1.10: Schématické zobrazenie izolácie proteínov pomocou GST a HIS tagu.

A) Pri purifikácii cez GST je vzorka obsahujúca tento proteín zachytená cez glutatión imobilizovaný v pevnej fáze. Disociácia nastáva po prídavku nadmerného redukovaného glutatiónu. Cieľový proteín je eluovaný aj s glutatiónom, ktorý je možné odstrániť dialýzou. B) Chelatačná afinitná chromatografia zachytáva proteín cez polyhistidínovú značku cez nikel imobilizovaný v pevnej fáze. Dochádza ku chelatacii medzi niklom a imidazolom na polyhistidínovej sekvencii. Proteín je eluovaný prídavkom imidazolu o vysokej koncentrácii. Kolóna môže byť regenerovaná premytím puframi.

Značenie HIS

Jedným z najrozšírenejších značení proteínov za účelom purifikácie chelatačnou afinitnou chromatografiou je polyhistidínová značka (HIS-tag). HIS-tag pozostáva zo

šiestich po sebe idúcich histidínových zvyškov, ktoré sa dokážu naviazať koordinačnou väzbou na ióny kovov: Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} . Pri prechode proteínového lyzátu polymérnymi nosičmi, ktorých sú súčasťou sú spomínané ióny sa proteíny obsahujúce HIS-tag na ne naviažu. Tým sa oddelia od ostatných bunkových proteínov. Najčastejšie využívaným ligandom je nikel. Výhodou značenia HIS je možná separácia rekombinantného proteínu priamo zo surového bunkového lyzátu [65]. Vďaka svojej minimálnej veľkosti a tomu, že je pri fyziologickom pH nenabitý, vo väčšine prípadov neovplyvňuje zbalenie proteínu ani neinterferuje so štruktúrou alebo funkciou fúzneho proteínu. Afinita HIS značenia ku kovovým ligandom navyše závisí len na primárnej štruktúre tagu, preto je možné purifikovať ako natívne, tak aj denaturované proteíny. [62]. Po naviazaní na polymérny nosič sa produkt môže ešte premývať, purifikácia polyhistidínového fúzneho proteínu však aj bez tohto kroku vedie ku jeho získaniu vo vysokej čistote [62, 65].

Značenie GST

V afinitnej chromatografii je široko rozšírené využívanie princípu vysokej afinity glutatión-S-transferázy k glutatiónu.

Glutatión je tripeptid obsahujúci tri aminokyseliny - cysteín, kyselinu glutámovú a glycín. Je dôležitý pri tvorbe disulfidických väzieb v proteínoch a pri transporte aminokyselín cez bunkovú membránu. Je substrátom pre enzým glutatión-S-transferázu a reaguje najčastejšie s nebezpečnými chemickými látkami za cieľom ich inaktivácie [66]. Vo vodnom roztoku je glutatión okamžite oxidovaný na dimér [68].

GST je proteín veľký 26 kDa, ktorý sa prirodzene vyskytuje v eukaryotických bunkách. Pokiaľ je rekombinantný proteín exprimovaný vo fúzii s glutatión-S-transferázou, matrica pozostávajúca z kroslinkovanej agarózy Sepharose so začleneným glutatiónom je schopná tento fúzny rekombinantný proteín naviazať. Po purifikácii môže byť proteín eluovaný pri miernych podmienkach prídavkom glutatiónu do elučného pufru [67].

Špecifickou proteázou je možné docieľiť odštiepenie GST od rekombinantného proteínu. Hydrolýza môže byť uskutočnená ešte kým je fúzny proteín naviazaný na matricu, čo je veľmi pohodlnou metódou separácie GST-tagu od cieľového proteínu. Aktivita glutatiónu môže byť ovplyvnená aktivitou γ -glutamyl transpeptidázy, ktorá sa nachádza v surovom lyzáte, preto je jej opakované použitie obmedzené [65].

Táto metóda so sebou nesie niekoľko nevýhod napriek tomu, že proteíny obsahujúce GST sú spravidla exprimované vo vysokých koncentráciách. Vysoká koncentrácia veľkého fúzneho proteínu môže viesť ku vzniku proteínových inklúzií. A keďže afinita glutatiónu ku GST je podmienená správnu trojrozmernou štruktúrou vytvorenou správnym zbalením proteínu, nerozpustné fúzne proteíny je potrebné ešte pred purifikáciou prebaľiť do správnej štruktúry. Veľkosť GST-tagu môže byť tiež nevýhodou pri purifikácii a diméry, ktoré vznikajú, môžu neskôr vlastnosti označeného proteínu ovplyvniť. Vedľajším produktom elúcie v *E. coli* môže byť šaperonín, ktorý je možné odstrániť prídavkom 5 mM MgCl_2 a 5 mM ATP pred purifikáciou [65]. Veľkosť GST-tagu môže byť ďalšou nevýhodou pri purifikácii. Diméry, ktoré vznikajú, môžu vlastnosti proteínu ovplyvniť [69].

Pri štúdiu rozdielu výťažnosti proteínov exprimovaných s HIS aj GST tagom bolo zistené, že purifikácia Ni-agarózou vykazovala v niektorých prípadoch podstatne vyššie koncentrácie proteínu. Tento rozdiel bol pravdepodobne spôsobený neúplnou elúciou proteínu naviazaného na agarózu cez GST [70].

2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

2.1 Cieľ práce

Cieľom experimentálnej časti tejto práce bolo: 1. Izolovať pDNA vektorov vstupujúcich do LR reakcie 2. Pripraviť expresné vektory pre produkciu izoform proteínu p53 použitím Gateway systému klonovania 3. Izolovať pDNA expresných vektorov 4. Overiť ich správnosť sekvenáciou 5. Porovnať izoláciu exprimovaných proteínov afinitnou chromatografiou cez GST a HIS značenie

2.2 Použitý materiál

2.2.1 Kity a kolóny

- Izolačný kit pre plazmidy NucleoSpin® Plasmid; Macherey-Nagel
- Izolačný kit pre plazmidy Isolate II Plasmid Mini Kit; Biotin
- Kolóny pre afinitnú chromatografiu Econo–Pac® Disposable Chromatography columns, 10 ml; Bio Rad
- Reagenty pre purifikáciu proteínov značením GST Protino® Glutathione Agarose 4B; Macherey-Nagel
- Kit pre purifikáciu proteínov značením HIS, Capturem His-Tagged Purification MiniPrep kit; Macherey-Nagel
- Kit na prípravu vzoriek pre sekvenovanie Mix2Seq; Eurofins Genomics
- Primery T7 forward a T7 reverse pre sekvenovanie; Thermo Fisher Scientific

2.2.2 Enzýmy

- *PvuII*-HF®; NEB
- Pufor CutSmart® 10X; NEB

2.2.3 Kultúry - kompetentné bunky

- BL-21 CodonPlus Competent cells, *E. coli*; Agilent Technologies
- One Shot Stbl3 Chemically Competent *E. coli*; Thermo Fisher Scientific
- One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*; Thermo Fisher Scientific
- One Shot *ccdB* Survival 2 T1^R Competent Cells, *E. coli*; Thermo Fisher Scientific

2.2.4 Plazmidy

- Gateway pDONR221 Vector; Thermo Fisher Scientific
- Vektor pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST, Biofyzikálny ústav Akadémie vied Českej republiky; upravený z pôvodného Gateway pDEST15 Vector; Thermo Fisher Scientific
- pENTR-gus positive control; Thermo Fisher Scientific

2.2.5 Chemikálie

- Agar; Himedia
- Agaróza; Serva
- AgNO₃; Serva
- Akrylamid; Serva
- Ampicilín; Biotika
- APS; VWR Life Science
- Bromfenolová modrá; Sigma-Aldrich
- Butan-1-ol; Lach:ner
- CaCl₂; Sigma-Aldrich
- Coomassie Brilliant Blue G - 250; Sigma-Aldrich

- Chloramfenikol; Duchefa Biochemie
- EDTA; Lachema
- Etanol; Penta
- Formaldehyd 37%; Lach:ner
- Glutatión; Sigma-Aldrich
- Glycerol; Lach:ner
- Glycín, Penta
- Glukóza; Lach:ner
- HCl 35 %; Lachema
- Imidazol; Sigma-Aldrich
- IPTG; Sigma-Aldrich
- Kanamycín; Duchefa Biochemie
- KCl; Sigma-Aldrich
- KH_2PO_4 ; Lach:ner
- Kvasinkový Extrakt; Himedia
- Kyselina octová; Penta
- Lyzozým; Sigma-Aldrich
- Metanol; Penta
- MgCl_2 ; Sigma-Aldrich
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich
- Na_2HPO_4 ; Lach-Ner
- NaCl; Lach:ner
- SDS; Sigma-Aldrich
- TEMED; Sigma-Aldrich
- Tris; Serva
- Tryptón; Serva
- β – merkaptotetanol; VWR Life Science

2.2.6 Prístroje

- Autokláv Microjet Personal Microwave Autoclave; Enbio
- Centrifúga U-320R; Boeco Germany
- Centrifúga 5430 R; Eppendorf
- Centrifúga mini Z 100 M; Hermle LaborTechnik
- Dokumentačný systém Azure c200, Azure biosystems
- Elektroforetická aparátúra Mini Protean Tetra Cell System; Bio-Rad
- Flowbox Aura Mini; Bioair Instruments
- Inkubátor 1000; Heidolph
- Sada mikropipet; Pipet4u
- Spektrofotometer; Implen
- Spektrofotometer Nanodrop 2000; Thermo Fisher Scientific;
- Termoblok Thermo-Shaker TS-100C; Biosan
- Trepáčka Mini Shaker; VWR Life Sciences
- Váha stolná Scout Pro SPU 402; Ohaus
- Vortex Genie 2; MoBio Laboratories
- Zdroj napätia PowerPac 300; Bio-rad

2.2.7 Ostatný materiál

- DNA Rebríček 1 kb DNA Ladder; New England Biolabs
- Fluorescenčné farbivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x; Biotium
- Inhibítor proteáz; Sigma-Aldrich
- pH papier; Lachema
- Proteínový rebríček Precision Plus Protein Dual Xtra Protein Standards 2–250 kDa; Bio-Rad
- Tablety Complete™ Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich

2.2.8 Bioinformatické nástroje

- Benchling
- SnapGene

2.2.9 Príprava médií, roztokov a pufrov

Médiá

LB médium 10 % tryptónu, 5 % kvasničného extraktu, 10 % NaCl v destilovanej vode, autoklávané v Microjet Personal Microwave Autoclave; Enbio

LA médium: 10 % tryptónu, 5 % kvasničného extraktu, 10 % NaCl, 14 % agaru v destilovanej vode, autoklávané v Microjet Personal Microwave Autoclave; Enbio

SOC médium: A) 20 % tryptónu, 5 % kvasničného extraktu, 0,5 % NaCl, 0,19 % KCl, 0,95 % MgCl₂, 1,2 % MgSO₄ · 7H₂O; B) 3,6 % glukózy; A) aj B) rozpustené v polovičnom objeme destilovanej vody; A) autoklávané v Microjet Personal Microwave Autoclave; Enbio B) sterilizované filtráciou (0,2 µm); fázy A) a B) zmiešané na dosiahnutie požadovanej koncentrácie

Zásobné roztoky antibiotík

Kanamycín: 50 mg/ml v destilovanej vode

Ampicilín: 100 mg/ml v destilovanej vode

Chloramfenikol: 25 mg/ml v etanole

Ampicilín bol skladovaný pri 4 °C a kanamycín s chloramfenikolom pri -4 °C. Po vychladení médií LB a LA na 45 °C boli antibiotiká pridávané v objeme 100 µl na 100 ml.

Roztoky pre izoláciu proteínov

PBS: 8g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ doplnené do 1000 ml destilovanou vodou (pH 7,3 bez úpravy)

Elučný roztok s glutatiónom: 0,606 g Tris-HCl, 0,307 g glutatiónu, pH 8)

Roztoky a pufry pre PAGE-SDS

5% AA (5 % akrylamid): bolo zmiešaných 12,5 ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 19:1), 12,5 ml 1M Tris-u (pH 6,4), 0,5 ml 20% dodecylsírany sodného (SDS) a 74,5 ml vody.

10 % AA (10 % akrylamid): 75 ml 40% akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 19:1), 112 ml 1M Tris (pH 8,8), 1,5 ml 20% dodecylsírany sodného (SDS) doplnené do 500 ml destilovanou vodou

1X Tris-Glycín SDS elektródový pufo: 3,03 g Tris, 14,4 g glycínu a 1 g SDS doplnené do 1000 ml destilovanou vodou

10 % APS: 1 g peroxodisírany amónneho v 10 ml destilovanej vody

2X Laemmliho nanášací pufo: 4 ml 10% SDS, 1,2 ml 1M Tris-HCl, 2 ml glycerolu, 1,8 ml destilovanej vody, 0,002 g bromfenolovej modrej a 1 ml beta-merkaptetoetanolu, uchovávanie pri 4 °C

Činidlá a roztoky pre vizualizáciu gélov po PAGE-SDS pomocou Coomassie blue a striebra

Stabilizačný roztok: 100 ml metanolu a 400 ml destilovanej vody

Farbiaci roztok: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G – 250, 450 ml metanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 450 ml vody

Odfarbovací roztok: bolo zmiešané 250 ml metanolu, 100 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 650 ml destilovanej vody

Fixačné činidlo: 500 ml metanolu, 120 ml koncentrovanej kyseliny octovej a 0,48 ml 37% formaldehydu doplnené destilovanou vodou do 1000 ml

Premývacie činidlo: 200 ml metanolu a 800 ml destilovanej vody

Senzibilizačné činidlo: 0,1274 g tiosírany sodného v 1000 ml vody

Farbiace činidlo: 0,5 g dusičnanu strieborného, 200 ml destilovanej vody v 250 ml odmernej banke uchované pri 4 °C, tesne pred použitím bolo pridaných 0,179 ml 37% formaldehydu a doplnené destilovanou vodou do 250 ml

Vyvíjacie činidlo: 60 g bezvodého uhličitanu sodného, 0,474 ml 37 % formaldehydu a 4 ml senzibilizačného činidla doplnené destilovanou vodou do 1000 ml

Terminačné činidlo: 120 ml koncentrovanej kyseliny octovej doplnená destilovanou vodou do 1000 ml

2.3 Metódy

Vstupným materiálom pre riešenie tejto práce boli plazmidové DNA izoforiem proteínu p53 naklonované v konštrukte pENTR221 na Biofyzikálnom ústave Akadémie vied Českej Republiky. Tie boli najprv transformované do kompetentných buniek určených na produkciu plazmidovej DNA (Stbl3 / TOP10). Tieto bunky boli následne kultivované a pDNA bola izolovaná v požadovanej koncentrácii. Potom jednotlivé plazmidy pENTR221 s kódovanými izoformami p53 podstúpili LR reakciu s vektorom pDEST15 a zreagovaná zmes bola transformovaná do kompetentných buniek Stbl3 / TOP10. Výsledné expresné klony boli selektované na ampicilín a po krížovom roztere samostatnej kolónie boli bunky obsahujúce expresné vektory kultivované a bola izolovaná pDNA. Pripravené expresné vektory boli skontrované pomocou gélovej elektroforézy nielen v kruhovom stave, ale aj po štiepení reštrikčnou endonukleázou. Enzým *PvuII*-HF[®] tieto expresné vektory štiepil nielen v oblasti sekvencie prítomnej v skelete plazmidu, v prípade izoforiem s C-terminálnym koncom α a β aj v oblasti inzertu. Nakoniec boli expresné vektory odoslané na sekvenáciu a prebehla izolácia proteínu $\Delta 160p53\gamma$ pomocou GST aj HIS tagu. Eluované proteíny

boli aj s jednotlivými frakciami z izolácie analyzované pomocou SDS-PAGE a bola porovnaná ich výťažnosť.

2.3.1 Príprava chemicky kompetentných buniek

Najprv boli pripravené kompetentné bunky kmeňa Stbl3 a TOP10 vhodné pre produkciu plazmidovej DNA - ENTRY klonov a expresných vektorov. Z alikvótu uchovávaného pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ alebo z Petriho misky boli zaočkované do 10 ml LB média (bez antibiotík) v Erlenmayerovej banke o objeme 50 ml a boli kultivované cez noc pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a otáčkach 300 rpm.

Na druhý deň bol za stáleho miešania prenesený 1 ml bakteriálnej kultúry do 100 ml LB média v 500 ml Erlenmayerovej banke.

Kultúry boli inkubované pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a otáčkach 300 rpm približne 3 hodiny do dosiahnutia optickej hustoty $\text{OD}_{600}=0,5-0,7$.

Následne bola kultúra rozdelená do schladených 50 ml plastových skúmaviek, tie boli vyvážené s presnosťou na dve desatinné miesta a inkubované 10 minút na ľade. Od tohto momentu sa pracovalo v komore pri teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vyvážené skúmavky boli centrifugované 10 min pri 6000 rcf a teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant bol odliaty, peleta rozsuspendovaná v 10 ml vychladeného 0,1 M roztoku CaCl_2 a inkubovaná 25 minút na ľade. Potom nasledovala centrifugácia po dobu 10 minút pri 6000 rcf. Vzniknutý supernatant bol odstránený a peleta bola znova rozsuspendovaná v 0,1 M roztoku CaCl_2 , tentokrát o objeme 1 ml. Suspenzia bola premiešaná s 0,2 ml sterilného 80 % glycerolu a pipetovaná do sterilných 1,5 ml skúmaviek po objeme 50 / 100 alebo 200 μl . Skúmavky obsahujúce alikvóty chemicky kompetentných buniek boli zamrazené v kvapalnom dusíku a uskladnené v hlbokomraziacom boxe pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 Transformácia plazmidovej DNA

Jednotlivé ENTRY klony boli transformované do buniek Stbl3. Na transformáciu boli použité alikvóty chemicky kompetentných buniek pripravené podľa postupu 2.3.1, ktoré boli rozmrazené na ľade. Štandardne bola na transformáciu použitá alikvóta buniek o objeme 50 μl , ku ktorej bolo pridaných 20-50 ng DNA. Bunky boli inkubované na ľade po dobu 1 h a potom bol prevedený teplotný šok. Skúmavky boli presunuté do termobloku nastaveného na teplotu $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde sa inkubovali 45 sekúnd a potom boli na dve minúty preložené naspäť na ľad. Napokon bolo pridaných 250 μl média SOC a vzorky boli kultivované po dobu 1 h v inkubátore pri teplote $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rýchlosti 300 rpm. Keďže pENTR221 klony v sebe nesú rezistenciu voči kanamycínu, 50 - 100 μl inkubovaných kultúr po transformácii bolo rozotretých na Petriho misku s LA médiom obsahujúcim kanamycín.

2.3.3 Izolácia pDNA

Na prevedenie LR reakcie bol izolovaný destinačný vektor pDEST15 pestovaný v bunkách *ccdB* Survival 2 T1^R a izoformy p53 v pENTR221 pestované v bunkách Stbl3.

Príprava bakteriálnych kultúr pre izoláciu pDNA a ich uchovávanie

Bunky boli zaočkované do 5ml LB média s prídavkom kanamycínu v skúmavke o objeme 15 ml. Po dobu 16-18 hod boli inkubované pri 37 °C v bakteriálnom inkubátore. Na druhý deň boli z buniek pripravené zásobné glycerolové kultúry (konzervy) zmiešaním 0,5 ml kultúry a 0,5 ml 80% sterilného glycerolu v skúmavke o objeme 1,5 ml. Konzervy boli uchovávané v mraziacom boxe pri –80°C. Zvyšné 4,5 ml kultúry boli centrifugované 3 min pri 2655 rcf, supernatant bol vyliaty a z bunkovej pelety bola izolovaná pDNA podľa protokolov jednotlivých kitov.

Izolácia kitom Isolate II Plasmid Mini Kit; Bioline

Pelety boli vortexovaním resuspendované v 1,5ml skúmavkách po pridaní 250 µl Pufru Resuspension Buffer P1. Lýza buniek prebiehala následným prídavkom 250 µl pufru Lysis Buffer P2. Potom boli vzorky opatrne premiešané pomalým otáčaním skúmaviek 6-8x a inkubované pri laboratórnej teplote maximálne 5 minút. Kýza bola ukončená prídavkom 300 µl pufru Neutralization Buffer P3. Vzorky potom boli znova opatrne premiešané pomalým otáčaním skúmaviek 6-8x. Lyzát bol klarifikovaný centrifugáciou po dobu 5 min pri 11000 rcf a laboratórnej teplote. Kolóna Spin Column bola vložená do zbernej skúmavky a celý objem supernatantu bol vyliaty na kolónu tak, aby sa peleta neuvolnila. Centrifugáciou po dobu 1 min pri 11000 rcf a laboratórnej teplote bol lyzát prefiltrovaný a na silikagélovú membránu sa naviazala DNA. Pretečená kvapalina bola vyliata a membrána bola premytá prídavkom pufru Wash Buffer (WB) PW1 ohriateho na teplotu 50 °C a znova centrifugovaná 1 min pri rovnakých podmienkach ako predtým. Membrána bola následne premytá pridaním 600 µl pufru Wash Buffer PW2 a centrifugáciou pri rovnakých podmienkach ako predtým. Pretečená kvapalina bola vyliata a membrána bola vysušená od premývacieho pufru dvojminútovou centrifugáciou pri 11000 rcf pri laboratórnej teplote. Kolóny boli premiestnené do novej skúmavky o objeme 1,5 ml a na vysušenie membránu bolo pridaných 40 µl elučného pufru. Po jednej minúte pri laboratórnej teplote bol izolát bol získaný centrifugáciou pri 11000 rcf. Nakoniec bola zistená koncentrácia a čistota eluovanej DNA na prístroji NanoDrop 2000.

Izolácia kitom NucleoSpin; Macherey-Nagel

Izolácia prebiehala obdobne ako kitom Bioline vrátane objemov jednotlivých pridávaných pufrov.

2.3.4 Agarová elektroforéza

Na analýzu expresných vektorov bol pripravený 1% agarózový gél. Pufor TAE bol zmiešaný s agarózou a zahrievaný v mikrovlnnej rúre až dokým nezačal vriť. Potom bol roztok vybratý a o malú chvíľu znova zahrievaný do objavenia prvých bubliniek. Tento krok bol opakovaný dvakrát na dosiahnutie homogénnej štruktúry gélu. Agarózový gél bol schladený pri laboratórnej teplote alebo za stáleho miešania pod tečúcou vodou na teplotu 55 °C a bolo pridané interkalačné činidlo GelRed 10000x. Gél bol dôkladne premiešaný a vyliaty do elektroforetickej vane s hrebeňom a tuhol pri laboratórnej teplote približne 30 min. Ako elektrolyt bol použitý pufor 1X TAE a vzorky boli nanášané na gél po zmiešaní s nanášacím pufrom Loading buffer 6X. Gél bol vystavený napätiu 100 V po dobu 4 h.

2.3.5 Gateway klonovanie - LR reakcia

Simulácia LR reakcie použitím softvérov Benchling a SnapGene

Vstupnými dátami pre bioinformatickú prácu boli sekvencie dvanástich izoformiem p53 v plazmide pENTR221 po BP reakcii. Najprv boli tieto dáta spracované v programe Benchling - sekvencie boli importované ako plazmidové mapy a jednotlivé boli anotované podľa komerčne anotovaného vektora pENTR221, ktorý bol získaný z otvorenej, voľne dostupnej databázy vektorov. Rovnako bol anotovaný aj destinačný vektor pDEST15-N6xHis-GST-GW-DEST (v tejto práci označovaný ako pDEST15). Sekvencie vektorov s izoformami p53 a pDEST15 boli následne exportované do programu SnapGene, kde bola použitá funkcia "LR reaction". Program rekombinoval entry vektory s destinačným vektorom za vzniku expresného vektora. Výsledné expresné vektory boli exportované a vrátené do programu v Benchling, v ktorom boli prevádzané ďalšie funkcie. Benchling neposkytuje funkciu "LR reaction", návrh jednotlivých plazmidov by bol zdĺhavý a náročný, preto bol použitý program SnapGene.

pDEST15 obsahujúci sekvencie kódujúce HIS aj GST fúzny proteín bol pripravený na Biofizikálnom ústave Akadémie vied Českej republiky. Plazmid pDEST15 kóduje značky GST a HIS za promótorom T7 a pred sekvenciami *AttR1* a *AttR2*, medzi ktorými sa nachádza rezistencia voči chloramfenikolu. Tieto sekvencie sú homológne so sekvenciami *AttL1* a *AttL2* v pENTR221. Po homológnej rekombinácii medzi sekvenciami *att* - LR reakcii sú výsledné expresné vektory rezistentné iba na ampicilín, pretože sekvencia *Cm^R* je po nahradení vloženou sekvenciou kódujúcou izoformu p53.

LR reakcia prebiehala medzi plazmidom pENTR221 s vloženou sekvenciou pre príslušný gén izoformy proteínu p53 a destinačným vektorom pDEST15. Rekombináciou týchto dvoch vektorov vznikol expresný vektor poskytujúci exprimovanému proteínu HIS aj GST značku zároveň. Schéma LR reakcie vytvorená z plazmidov anotovaných v programe Benchling je zobrazená na Obrázku 2.1.

Postup LR reakcie

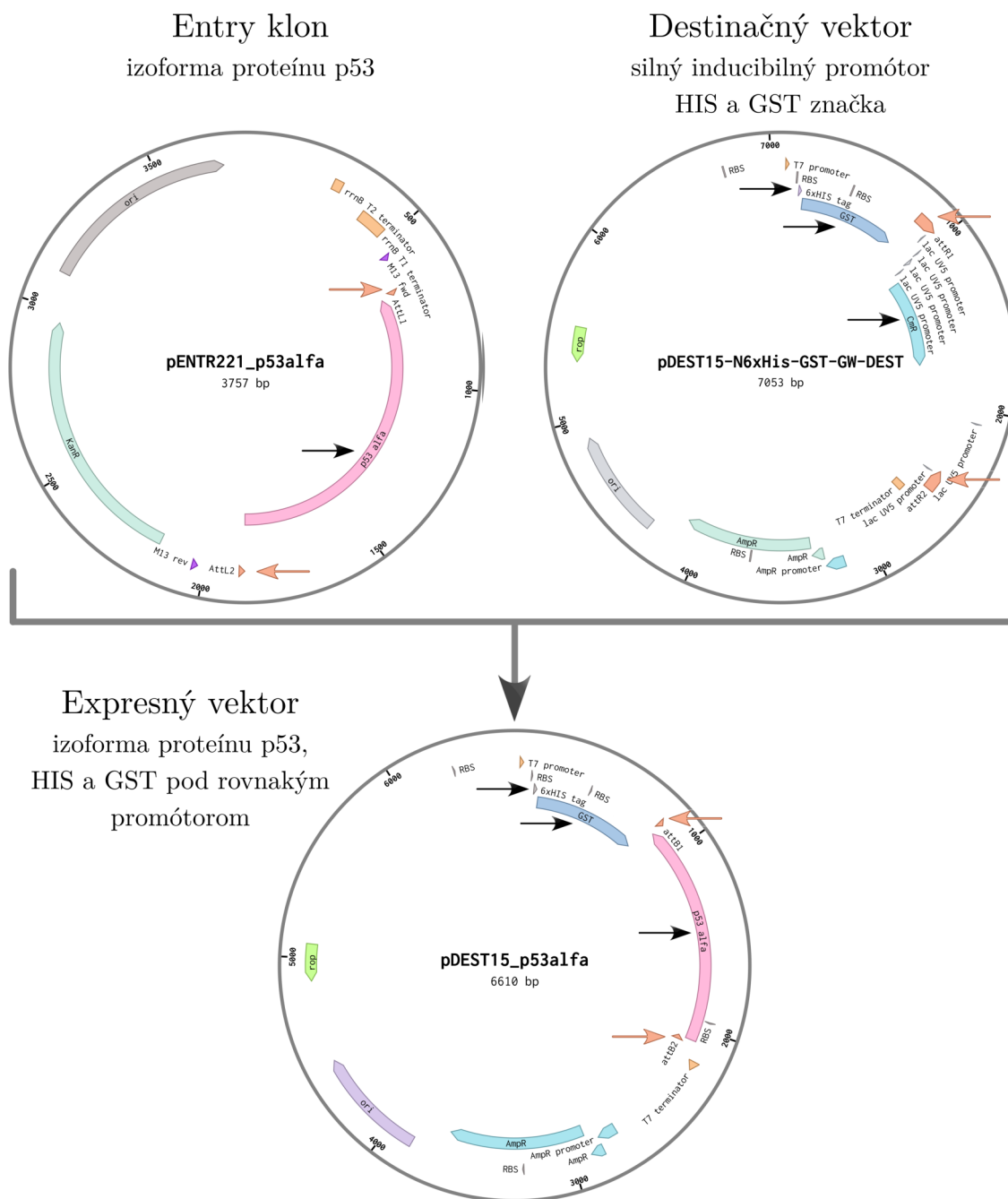
Bolo zmiešaných 100-150 ng ENTRY klonu a k nemu odpovedajúce dvojnásobné množstvo destinačného vektora a objem bol doplnený Milli-Q vodou do celkového objemu reagentov 8 μ l. Napokon boli pridané 2 μ l LR klonázového mixu a reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote cez noc.

Na druhý deň bol pridaný 1 μ l proteinázy K a vzorka bola inkubovaná 10 minút pri 37 °C, čím bola klonáza denaturovaná a reakcia ukončená.

Zreagovaný mix bol hneď potom transformovaný do chemicky kompetentných buniek *E. coli* kmeňa Stbl3 podľa postupu opísaného v sekcii 2.3.2 s upravenými objemami, aby bola transformácia účinnejšia. Transformovaný bol celý objem reagentu po LR reakcii (10 μ l) a bunky sa kultivovali v 1 ml SOC média minimálne 2 h. Ak rástli bunky po transformácii pomalšie, boli inkubované cez noc. Potom boli centrifugované dvomi spôsobmi. Buď pri 13 rcf 1-2 min, alebo krátkym stočením - centrifúga bola vypnutá hneď po dosiahnutí 1700 rcf. Vzniknutá peleta bola zo spodku skúmavky odpipetovaná a rozotretá na Petriho miskú s LA médiom obsahujúcim ampicilín.

Po 12-18 hodinovej inkubácii pri 37 °C boli transformanty spočítané a samos-

tatná kolónia bola preočkovaná krížovým rozterom na čerstvú Petriho misku s LA obsahujúcim ampicilín, ktoré boli inkubované 12-18 hodín pri 37 °C.



Obr. 2.1: Schéma LR reakcie prebiehajúcej medzi pENTR221p53-α a pDEST15.

Rekombinácia prebiehala medzi *AttL* a *AttR* homológnyimi časťami (zobrazené oranžovými šípkami). Sekvencia kódujúca p53 bola prenesená do pDEST15 výmenou za sekvenciu kódujúcu rezistenciu voči chloramfenikolu (zvýraznené čiernymi šípkami aj so sekvenciami kódujúcimi HIS a GST tag). Vektory boli vytvorené v programe Benchling.

2.3.6 Izolácia pDNA izoforiem p53 v pDEST15

Z krížového rozteru po LR reakcii bola zaočkováaná samostatná kolónia do 5 ml tekutého média LB obsahujúceho ampicilín. Po kultivácii cez noc boli pripravené bakteriálne konzervy podľa postupu uvedeného v 2.3.3. Izolácia expresných vektorov bola vykonaná rovnako ako izolácia Entry klonov podľa postupu opísaného v 2.3.3. Bol vynechaný krok prídavku premývacieho pufru PW1, pretože po jeho aplikácii boli zistené nižšie výťažky izolovanej plazmidovej DNA. Elučný pufr bol temperovaný na teplotu 64 °C pre elúciu DNA o vyššej koncentrácii. Inkubácia elučného pufru na kolónach s naviazanou pDNA navyiac prebiehala v termobloku pri teplote 64 °C po dobu 5-10 min.

2.3.7 Reštrikčné testy plazmidov

Kruhovú DNA sa vďaka svojej priestorovej štruktúre pohybuje gélom rýchlejšie ako lineárna a nie je možné určiť jej veľkosť v porovnaní s rebríčkou. Pre určenie veľkosti plazmidovej DNA je potrebné ju linearizovať použitím reštrikčnej endonukleázy. V programe Benchling boli preto nájdené dva enzýmy pre reštrikčné testy. Hľadaným enzýmom bol taký, ktorý konštrukt zlinearizuje, aby bolo možné určiť ich veľkosť. Takým enzýmom je napríklad *PstI*-HF[®], pretože štiepi expresný vektor v mieste ampicilínovej rezistencie, ktorú obsahujú všetky expresné vektory. Pre reštrikčné testy bol ale zvolený enzým *PvuII*-HF[®], ktorý štiepi expresný vektor viackrát a to aj v oblasti inzertu, čo umožní dokázanie prítomnosti vloženého génu. Enzým *PvuII*-HF[®] štiepi expresné vektory v jednom až dvoch miestach. Prvé štiepne miesto je prítomné v géne pre proteín *rop* (represor primeru), ktorý sa nachádza v expresných vektoroch všetkých izoforiem proteínu p53. Druhé štiepne miesto je v oblasti, ktorou sa proteín naväzuje na DNA. Táto oblasť však chýba všetkým izoformám $\Delta 160p53$, preto enzým *PvuII*-HF[®] tieto štiepi iba raz. Štiepenie bolo prevedené funkciou "Digests" v programe Benchling, čím boli zistené veľkosti štiepných produktov.

Reakčná zmes vždy pozostávala zo 100-120 ng DNA, 0,5 μ l enzýmu a 1 μ l pufru CutSmart[®] 10X, ktorá bola doplnená Milli-Q vodou na celkový objem 10 μ l v skúmavkách o objeme 1,5 ml. Inkubácia prebiehala na termobloku pri teplote 37 °C po dobu 40 min. Ku naštiepenej DNA boli pridané 2 μ l nanášacieho pufru Loading buffer 6X, vzorky boli nanesené na gél a analyzované gélovou elektroforézou.

2.3.8 Sekvenácia DNA

Správnosť naklonovaných expresných vektorov bola zistená sekvenáciou od oblastí promótora a terminátora T7. 5 μ l vzorky plazmidovej DNA o koncentrácii v rozmedzí 50-100 ng/ μ l bolo zmiešaných s 5 μ l primeru T7 forward alebo reverse o koncentrácii 5 μ M. Takto pripravené vzorky boli odoslané na sekvenáciu Sangerovou metódou.

Porovnanie DNA po sekvenácii

Po obdržaní výsledkov zo Sangerovej sekvenácie boli tieto surové dáta importované do programu Benchling, kde boli funkciou Alignments porovnané s navrhnutými vektormi. Bola sledovaná správnosť počiatočných a konečných sekvencií, ktoré odpovedajú jednotlivým skráteniam kódovaného proteínu p53.

2.3.9 Indukcia a izolácia proteínu

Na demonštráciu indukcie, izolácie a purifikácie proteínov z pripravených konštruktov bol použitý vektor pDEST15- Δ 160p53 γ .

Indukcia proteínu

Proteín bol produkovaný bunkami BL-21, ktoré sú vhodné na produkciu proteínov kódovaných za promótorom s vysokou úrovňou transkripcie. Kompetentné bunky boli pripravené podľa postupu 2.3.1. Do kmeňa BL-21 bola transformovaná pDNA podľa klasického postupu opísaného v 2.3.2. Samostatná kolónia po transformácii bola prenesená na ďalšiu Petriho misku s ampicilínom, rozotretá krížovým rozterom a kultivovaná pri 37 °C cez noc.

Samostatná kolónia po krížovom roztere bola poobede zaočkovaná do 5 ml média LB s ampicilínom a inkubovaná pri teplote 37 °C a otáčkach 300 rpm po dobu 16-18 hodín (cez noc).

Na druhý deň bola pripravená z kultúry konzerva, aby sa zachovala kultúra, z ktorej boli proteíny produkované. V 1,5 ml skúmavke bola zmiešaná kultúra o objeme 0,5 ml s 0,5 ml 80% sterilného glycerolu vortexovaním a uchovaná pri -80 °C pre prípadné ďalšie použitie.

Ako inokulum bol použitý 1 ml kultúry, ktorá rástla cez noc. Toto množstvo inokula bolo pridané do 25 ml média LB s ampicilínom v Erlenmeyerovej banke o objeme 100 ml. Po zaočkovaní bola banka umiestnená v inkubátore a bola miešaná pri teplote 37 °C a otáčkach 300 rpm približne jednu hodinu. Po tomto čase bola skontrolovaná optická hustota na spektrofotometri, ktorá podala informáciu o množstve buniek v kultúre. Pri meraní bolo ako slepá vzorka použité LB médium s ampicilínom a meranie prebiehalo po riedení 1:9 s týmto médiom. Hodnota OD bola preto vynásobená desiatimi a bunky rástli pri zmenených podmienkach až do dosiahnutia OD 0,6-0,8 (tzn. pri riedení 1:9 0,06-0,08).

Po dosiahnutí hľadaného OD bola odobratá vzorka K1. 100 μ l bolo napipetovaných do skúmavky o objeme 1,5 ml a uchovaných pri -20°C. Potom došlo k indukcii produkcie proteínov prídavkom 25 μ l 1M IPTG. Následne boli kultúry prenesené na trepačku pri laboratórnej teplote a kultivované po dobu 2 h. Po 2 hodinách od indukcie bola odobratá vzorka K2 rovnakým spôsobom ako K1.

Po dvoch hodinách od indukcie IPTG prebehla centrifugácia kultúr. Na analytických váhach boli zvážené dve 15 ml skúmavky so šrubovacím zatváracím (s presnosťou na 4 desatinné miesta). Hmotnosť skúmaviek bola zistená na váhe s presnosťou 0,00 a odpipetovaním bola dosiahnutá rovnaká hmotnosť oboch skúmaviek. Vyvážené skúmavky boli centrifugované pri teplote 4 °C a 500 rcf po dobu 5 min. Po centrifugácii z nich bol vyliaty supernatant a potom boli znova vložené do centrifúgy na pár sekúnd, aby sa kvapalina zo stien dostala na spodok. Potom bol supernatant opatrne odpipetovaný zo skúmaviek tak, aby sa neporušila peleta. Skúmavky boli znova odvážené na analytických váhach a bola zistená hmotnosť pelety.

Od tohto momentu samotná izolácia prebiehala pri 4 °C v chladnej komore, vo vychladenej centrifúge a medzi jednotlivými prístrojmi boli vzorky prenášané na ľadovej drti.

Získanie bunkového lyzátu

Lýza buniek prebiehala použitím pufru xTractor™ Buffer z kitu Capturem His-Tagged Purification MiniPrep kit, Macherey-Nagel. K vychladenej bunkovej pelete bol pridaný pufor v množstve 100 μ l na 10 mg pelety. Toto množstvo väčšinou činilo približne 800 μ l. Potom bolo pridaného 100 μ l lyzozýmu o koncentrácii 20 ng/ μ l a 40 μ l inhibítora proteáz. Vzorky boli inkubované na ľade po dobu 10 min a následne centrifugované pri teplote 4 °C a 10620 rcf po dobu 20 min. Lyzát bol rozdelený na dve polovice a proteíny boli izolované prostredníctvom dvoch rôznych značení - HIS a GST.

Izolácia proteínov cez značenie HIS

Izolácia proteínov cez značku HIS bola prevedená kitom Capturem His-Tagged Purification MiniPrep kit, Macherey-Nagel. Najprv bol lyzát prenesený na kolónu Capturem Miniprep Nickel Column a proteíny boli zachytené na membráne po centrifugácii pri teplote 4 °C a 12850 rcf po dobu 1 min. Pretečený lyzačný pufor bol uchovaný ako vzorka K3. Pri rovnakých parametroch centrifugácie bola kolóna premytá 300 μ l pufru Wash Buffer (pretečený pufor bol uchovaný ako vzorka K4) a hneď potom boli proteíny 2x eluované v 100 μ l Elution Buffer. Obe elúcie boli zmiešané s glycerolom do jeho celkového obsahu 10% a označené ako vzorky HE1 a HE2.

Izolácia proteínov cez značenie GST

Na izoláciu bola najprv použitá kolóna pre afinitnú chromatografiu Econo-Pac® Disposable Chromatography column, 10 ml. Všetky roztoky boli vychladené na teplotu 4 °C a pri rovnakej teplote prebiehala celá práca. Lyzát bol zmiešaný v skúmavke o objeme 1,5 ml s 250 μ l Protino® Glutathione Agarose 4B a inkubovaný 30 min v termobloku pri 4 °C a otáčkach 300 rpm. Potom bol lyzát s agarózou napipetovaný do kolóny a po jej zavretí cez ňu pretiekol celý objem. Následne bola kolóna 3x premytá napipetovaním 500 μ l roztoku PBS a pretečením cez kolónu. Proteín bol 3x eluovaný pomocou pufru Elution Buffer s glutatiónom o objeme 300 μ l za získania vzoriek GE1, GE2 a GE3. Proteinové elúcie boli zmiešané s glycerolom do jeho celkového obsahu 10%.

Na prístroji NanoDrop 2000 boli zistené koncentrácie vzoriek K1, K2, K3, K4, HE1, HE2, GE1, GE2 a GE3 meraním pri vlnovej dĺžke $\lambda = 280\text{nm}$. Všetky frakcie boli uchované pri teplote -20 °C a neskôr analyzované pomocou PAGE-SDS.

2.3.10 Analýza proteínov pomocou PAGE-SDS

Všetky frakcie získané pri izolácii proteínu $\Delta 160\text{p}53\gamma$ boli analyzované pomocou PAGE-SDS. Boli pripravené dva gély - jeden pre farbenie striebrom a druhý pre vizualizáciu farbou Coomassie blue. Polyakrylamidový gél pozostával z dvoch vrstiev - separačnej a koncentračnej. Najprv bola pripravená separačná vrstva (spodná) - zmiešaním 10 ml 10% AA so 100 μ l APS a 30 μ l TEMED. Táto vrstva bola naliata medzi sklíčka a okamžite preliata butanolom, ktorý vyrovnal vrchnú líniu a zamedzil vzniku bubliniek. Po polymerizácii, ktorá bola identifikovaná stuhnutím zvyškov gélu v kadičke, bol butanol vyliaty a jeho zvyšky medzi sklíčkami vysušené filtračným papierom. Potom bola pripravená koncentračná (horná) vrstva zmiešaním 3ml 5%

AA s 30 μ l APS a 9 μ l TEMED. Po naliatí medzi sklíčka bol zvrchu vložený vložený hrebeň a gél tuhol približne 1 hodinu. Stuhnúty gél bol následne premiestnený do aparatury a preliaty Elektroódovým pufrom 1X.

Vzorky na analýzu boli pripravené zmiešaním 20 μ l frakcií z izolácie a 10 μ l pufru CSB 4X. Takto pripravené vzorky boli denaturované pri 95 °C 5 minút a nadávkované na gél. Elektroforéza prebiehala v 3 fázach. Prvých 16 minút bolo napätie nastavené na 50 V, nasledujúcich 15 minút sa zvýšilo na 100 V a elektroforéza pokračovala pri 150 V, až dokým sa brómfenolová modrá farba nedostala na spodok gélu.

Farbenie gélu pomocou farbiva Coomasie blue

Gél bol najprv opatrne premiestnený do stabilizačného roztoku v sklenenej miske, kde bol trepaný pri laboratórnej teplote 5 min. Potom bol nahradený roztokom s farbivom Comassie Blue, v ktorom bol trepaný 15 min pri laboratórnej teplote. Potom bol gél 3x vypláchnutý odfarbovacím roztokom Destain a nakoniec bol v tomto roztoku ponechaný na trepačke cez noc, aby sa vymyla všetka farba, ktorá nebola naviazaná na proteíny.

Farbenie gélu striebrom

Gél bol opatrne uvoľnený do pripravenej sklenenej misky a ponechaný vo fixačnom činidle na trepačke pri laboratórnej teplote 2 hodiny. Potom bol premytý premývacím činidlom, ktoré bolo vymenené 3x po desiatich minútach. Ďalej bol premytý destilovanou vodou a zaliaty senzibilizačným činidlom presne na 1 minútu. Po odliatí tohto činidla bol znovu premytý destilovanou vodou a ponechaný v ochladenom farbivom roztoku 20 minút. Nakoniec bol znovu premytý destilovanou vodou a bolo započaté vyvíjanie pridaním vyvíjacieho činidla až dokým sa nezobrazili bendy o požadovanej intenzite. Vyvíjanie bolo ukončené terminačným činidlom a nakoniec premyté destilovanou vodou.

Gély boli odfotené na dokumentačnom prístroji Azure c200 pri viditeľnom svetle.

3. VÝSLEDKY A DISKUSIA

3.1 Izolácia ENTRY klonov

Plazmidovú DNA izoforiem p53 v pENTR221 a pDEST15 bolo potrebné izolovať v koncentrácii približne 50 ng/μl na uskutočnenie LR reakcie. Vzhľadom na opakované nízke výťažky bol proces izolácie optimalizovaný. Ako je uvedené v postupe 2.3.3, vzorky boli najprv premývané pufrom PW1 za účelom dosiahnutia vysokej čistoty. (Čistota DNA je charakterizovaná pomerom absorbancií 260/280 v rozmedzí 1,75-1,95 [59].) Neskôr bolo zistené, že premývanie pufrom PW1 znižuje výťažky DNA a navyše predlžuje čas izolácie kvôli zahrievaniu pufru na 50 °C. Ako môžeme vidieť v tabuľke 3.1, po vynechaní tohto kroku sa čistota izolovanej DNA stále nachádzala v rozmedzí 1,6-1,8. Výťažky pDNA sa mierne zvýšili a proces trval kratšie. Rápídny nárast výťažkov však nastal až transformáciou do nových buniek kmeňa Stbl3. Vplyvom ďalších parametrov na výťažnosť izolácie sa bude práca zaoberať v sekcii 3.3.1.

Tabuľka 3.1: Nárast výťažkov izolácie Entry klonov po vynechaní kroku premývania patróny predhriatym pufrom PW1 a použití nových kompetentných buniek.

pôvodné Stbl3, PW1			nové Stbl3, bez PW1			
	pENTR221	c [ng/μl]	260/280	pENTR221	c [ng/μl]	260/280
1.	Δ133p53α	22,8	1,75	Δ40p53α	84,3	1,80
2.	Δ160p53α	33,6	1,72	Δ133p53α	115,1	1,75
3.	p53β	17,0	1,81	Δ40p53β	125,7	1,86
4.	Δ160p53β	48,1	1,62	Δ133p53β	134,7	1,80
5.	p53γ	30,5	1,76	p53γ	84,0	1,81
6.	Δ40p53γ	34,2	1,69			
7.	Δ133γ	39,8	1,70			
8.	Δ160γ	28,8	1,75			
Priemer:		30±10		Priemer:	98±20	

3.2 LR reakcia

V LR reakcii bolo rekombinovaných 12 izoforiem proteínu p53 v ENTRY klonoch s vektorom pDEST15. Koncentrácie a množstvá pDNA použitých na LR reakciu sú zhrnuté v tabuľke 3.2. Všetky naklonované izoformy proteínu p53 okrem Δ133p53β poskytli nárast transformantov. Rast pDEST15-Δ133p53β nebol pozorovaný ani po niekoľkých opakovaníach LR reakcie s upravenými podmienkami transformácie a predĺženej dobe kultivácie, preto nie je uvedený v tabuľke.

Veľkosť Entry vektora obsahujúceho najdlhší inzert - proteín p53 v celej dĺžke (označovaného ako FLp53 alebo p53α) je 3757 bp. Destinačný vektor pozostáva zo

Tabuľka 3.2: Koncentrácie a množstvá plazmidových DNA použitých na LR reakciu a počet kolónií získaných po transformácii

	pENTR221			pDEST15			Počet kolónií
	c [ng/μl]	V [μl]	m [ng]	c [ng/μl]	V [μl]	m [ng]	
p53α	19,7	4,7	93	57,2	3,3	186	48
Δ40p53α	219,1	0,7	150	57,2	5,2	300	13
Δ133p53α	115,1	1,3	150	57,2	5,2	300	209
Δ160p53α	34,7	3,0	100	39,8	5,0	200	80
p53β	42,8	2,1	90	39,8	4,5	179	87
Δ40p53β	213,9	0,7	150	57,2	5,2	300	42
Δ160p53β	87,7	1,3	110	32,4	6,8	220	142
p53γ	84,1	1,8	150	57,2	3,3	186	85
Δ40p53γ	60,2	1,7	102	42,4	4,9	204	27
Δ133p53γ	58,1	1,7	99	39,8	5,0	199	172
Δ160p53γ	34,3	3,0	100	39,8	5,0	200	18

7053 párov báz, čo je približne dvakrát viac oproti Entry klonu. Na každú LR reakciu bola teda použitá dvakrát väčšia hmotnosť destinačného vektora v pomere ku Entry klonu, aby bol dosiahnutý ich ekvimolárny pomer. Podľa protokolu od Invitrogen [71] je na LR reakciu odporúčané použiť 50-150 ng Entry klonu. Podľa predošlých pokusov v našich laboratóriách bolo najúčinnnejšie uskutočniť LR reakciu v množstve 150 ng Entry klonu a 300 ng pDEST15. Niektoré Entry klony však opakovane nebolo možné izolovať v požadovanej koncentrácii, preto bolo na LR reakciu použité menšie množstvo pDNA. Vždy bol však zachovaný ekvimolárny pomer Entry a destinačného vektora. Z tabuľky 3.2 je však zjavné, že počet kolónií získaných po transformácii primárne nesúvisel s množstvom pDNA použitej na LR reakciu. Pri použití 150 ng pENTR221-Δ133p53α bolo napríklad získaných až 209 kolónií, no pri rekombinácii rovnakého množstva pENTR221-Δ40p53α bol pozorovaný nárast iba trinástich kolónií.

Kvôli niekoľkým počiatočným neúspešným pokusom LR reakcie boli obmieňané podmienky následnej transformácie. Samotná LR reakcia bola vždy uskutočnená pri laboratórnej teplote cez noc. Na rozdiel od štandardného postupu transformácie (uvedeného v sekcii 2.3.2), pri LR reakcii bol použitý väčší objem média SOC, vďaka čomu bolo možné bunky kultivovať dlhšiu dobu. Podľa protokolu v praxi zaužívaného na Biofyzikálnom ústave Českej republiky by mali byť vzorky centrifugované 1-2 min s pri otáčkach 13 rcf. Pri týchto podmienkach sa však vo väčšine prípadov nevytvorila viditeľná peleta, ktorá by bola vhodná na rozotretie na Petriho miskách. Preto bola predĺžená dĺžka inkubácie a vzorky boli pri daných podmienkach inkubované cez noc. Jednoduchšie a časovo menej náročné riešenie však bolo zmeniť podmienky centrifugácie - po dvoch hodinách inkubácie boli skúmavky odstredené krátkou centrifugáciou do dosiahnutia 1700 rcf. Na rozdiel od centrifugácie pri nižších otáčkach boli v takto odstredených vzorkách vytvorené pelety dostatočne veľké na nabratie a rozotretie na Petriho miskách. Dvojhodinová kultivácia s následnou krátkou centrifugáciou do 1700 rcf poskytla počet kolónií porovnateľný s transformantmi získanými kultiváciou cez noc a centrifugáciou pri 13 rcf.

3.3 Expresné vektory

3.3.1 Optimalizácia izolácie pDNA expresných vektorov

Vynechaním premývacieho roztoku PW1 sa výťažky pDNA zvýšili len mierne (Tabuľka 3.1), determinujúcim faktorom pri izolácii sa javila kompetencia buniek a teplota elúcie. Podľa protokolov jednotlivých kitov by mala byť elúcia prevádzaná elučným roztokom laboratórnej teploty, ktorý je v kolóne ponechaný len jednu minútu pred finálnou centrifugáciou [72, 73]. Elúcia DNA je však závislá nielen na vysokom pH a nízkej iónovej sile, ale aj na teplote [74]. Vplyv teploty na elúciu pDNA bol sledovaný pri izolácii destinačného vektora pDEST15, kedy bol nárast koncentrácie pDNA zaznamenaný po dodatočnej inkubácii pri 64 °C. Vplyv teploty na elúciu DNA zo silikagélovej matrice bol študovaný už skôr. Huang et al. uviedli, že pri inkubácii elučného pufru po dobu 3 min pri teplote 60 °C bolo eluované približne dvakrát vyššie množstvo regenerovanej DNA ako pri elúcii pufrom o teplote 40 °C [75]. V našom prípade boli eluáty získané minútovou inkubáciou pri laboratórnej teplote naspäť napipetované na kolóny. Desaťminútová inkubácia vzoriek pri teplote 64 °C zvýšila koncentráciu pDNA v eluátoch niekoľkonásobne. Priemerná koncentrácia pri izolácii A) sa zvýšila približne dvakrát, z 10 ± 3 ng/μl na 18 ± 2 ng/μl a pri izolácii B) vzrástla približne trikrát - z 20 ± 4 ng/μl na 60 ± 15 ng/μl. Bolo tak dokázané, že teplota elučného pufru má zásadný vplyv na uvoľnenie DNA zachytenej v silikagélovej matrici. Pri všetkých nasledujúcich izoláciách boli pDNA pred poslednou centrifugáciou inkubované pri teplote 64 °C aspoň po dobu 10 min.

Tabuľka 3.3: Nárast koncentrácie izolovaného pDEST15 po zahriatí elučného pufru na 64 °C.

Inkubácia pri LT, 1 min			Inkubácia pri 64 °C, 10 min	
pDEST15	c [ng/μl]	260/280	c [ng/μl]	260/280
A)	1.	8,0	1,88	20,1
	2.	9,6	1,83	17,9
	3.	14,0	1,78	16,6
Priemer:		10 ± 3	18 ± 2	
B)	1.	16,7	1,63	76,7
	2.	18,7	1,75	57,2
	3.	24,8	1,84	47,1
Priemer:		20 ± 4	60 ± 15	

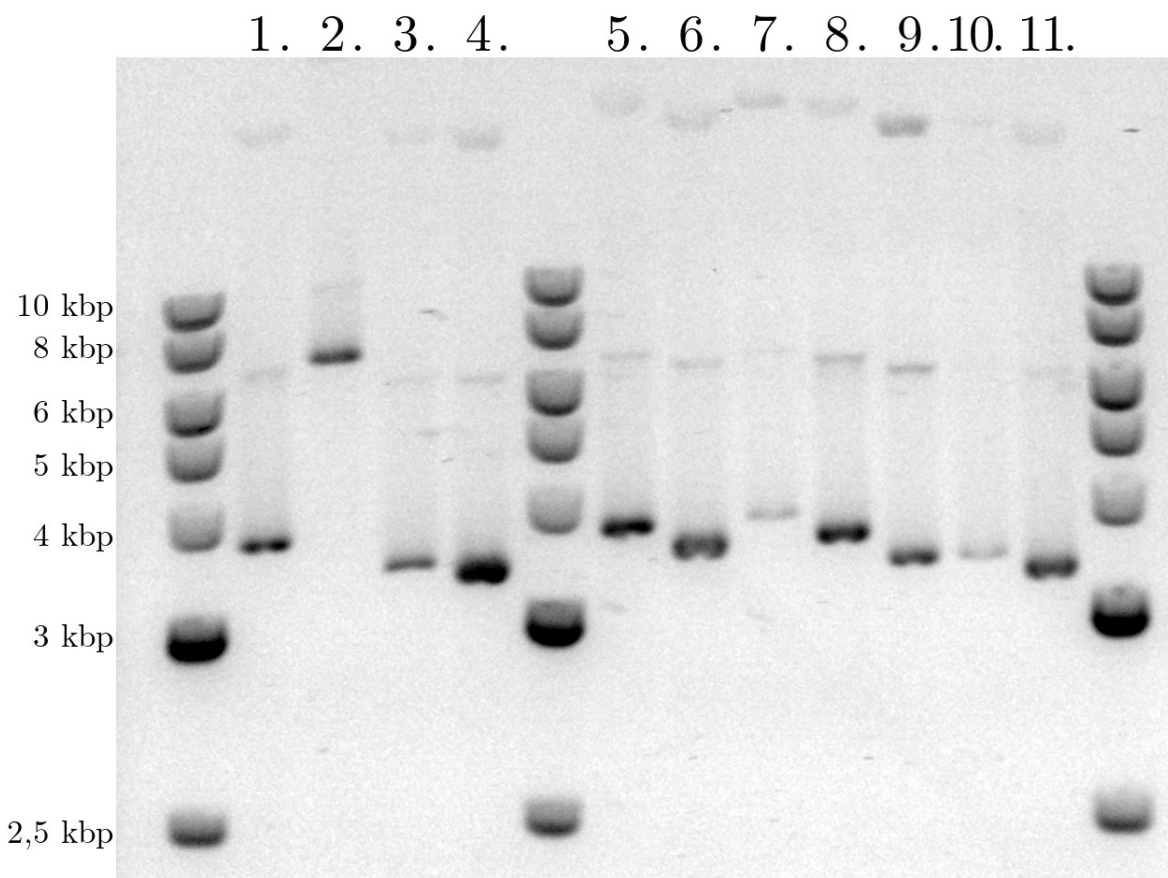
Na produkciu plazmidov boli vždy použité nami pripravené kompetentné bunky - najprv kmeň *E.coli* Stbl3 a neskôr aj TOP10. Stbl3 sa vyznačujú svojou schopnosťou produkovať vysoké výťažky pDNA, ktoré môžu byť až desaťkrát vyššie ako v bunkách TOP10 [76]. Napriek tomu bola priemerná koncentrácia izolovanej pDNA z buniek Stbl3 (20 ± 3 ng/μl) o niečo nižšia ako z buniek TOP10 (34 ± 8 ng/μl). Významný nárast koncentrácie pDNA bol zaznamenaný až pri jej produkcii čerstvými bunkami Stbl3. Táto skutočnosť indikuje problém týkajúci sa pôvodných buniek Stbl3. Kompetentné bunky sa pripravovali vždy zaočkovaním z alikvótu kompetentných buniek z predošlej várky a materská kultúra bola stará približne 7 rokov. Pôvodne výťažné kompetentné bunky poskytovali po niekoľkých rokoch používania

veľmi nízke výťažky pDNA. Po transformácii plazmidov do kompetentných buniek Stbl3 pripravených z novej zásobnej kultúry stúpala ich priemerná koncentrácia na 65 ± 16 ng/ μ l. Na základe tejto skutočnosti môžeme dôvod zníženia efektivity produkcie transformovaného plazmidu iba predpokladať. V priebehu siedmich rokov práce s týmito bunkami mohlo v laboratórnych podmienkach, ktoré môžu byť náchylné na kontamináciu cudzorodými DNA, dôjsť k niekoľkým javom. Zníženie efektivity produkcie plazmidovej DNA mohlo byť napríklad spôsobené mutáciou genómu alebo kontamináciou iným kmeňom *E. coli* s horšou schopnosťou produkcie pDNA. V laboratórnych podmienkach, kde sa pracuje s plazmidovými DNA s rôznymi rezistenciami, je pri nesprávne dodržiavanej hygiene kontaminácia bežnou záležitosťou. Kompetentné bunky mohli byť kontaminované aj neželanou plazmidovou DNA s rezistenciou odlišnou od tej, na ktorú sú selektované transformanty. Prítomnosť nežiadanej pDNA by mohla odkloniť tok nukleotidov od nami transformovaných plazmidov bez toho, aby bola jej ko-transformácia detekovateľná. To by vysvetľovalo tak zásadnú zmenu výťažnosti starých buniek Stbl3. Postup prípravy kompetentných buniek, kedy je nová várka očkovaná z predošlej, je veľmi náchylný na kontamináciu. Bunky by mali byť pripravované vždy zo zásobnej - materskej kultúry, ktorá je uchovaná pri -80 °C a nepodlieha sústavnému vystavovaniu potenciálnym kontaminantom pri manipulácii s kultúrou.

Tabuľka 3.4: Koncentrácia izolovaných expresných vektorov v rôznych kompetentných bunkách.

pDEST15	Stbl3		TOP10		čerstvé Stbl3	
	c [ng/ μ l]	260/280	c [ng/ μ l]	260/280	c [ng/ μ l]	260/280
p53 α	-	-	-	-	48,2	1,71
Δ 40p53 α	20,6	1,77	-	-	47,1	1,69
Δ 133p53 α	-	-	-	-	68,8	1,82
Δ 160p53 α	20,4	1,78	46,2	1,56	94,8	1,69
p53 β	17,8	1,74	22,2	1,69	59,0	1,69
Δ 40p53 β	-	-	-	-	55,5	1,72
Δ 160p53 β	-	-	77,4	1,68	-	-
p53 γ	14,0	1,65	33,8	1,60	51,6	1,69
Δ 40p53 γ	-	-	30,1	1,77	91,4	1,62
Δ 133p53 γ	17,8	1,68	31,1	1,75	62,7	1,78
Δ 160p53 γ	19,7	1,77	40,4	1,65	58,3	1,72
Priemer:	20 ± 3		34 ± 8		65 ± 16	

3.4 Analýza expresných vektorov



Obr. 3.1: Gélová elektroforéza expresných vektorov po izolácii.

Na obrázku 3.1 vidíme expresné vektory vzniknuté LR reakciou po elektroforetickej separácii v poradí uvedenom v tabuľke 3.5. Najintenzívnejšie bendy patria superhelikálnym DNA a ich veľkosti v rozmedzí od 6 do 6,6 kbp sa nachádzajú v oblasti bendov 3-4 kbp. Ich poloha na géli približne koreluje s rozdielmi ich veľkostí. Vo väčšine vzoriek je možné pozorovať prítomnosť oc-DNA, ktorá putuje gélom pomalšie ako superhelikálna [61]. Veľké fragmenty, ktoré sa nachádzajú nad najväčším bandom rebríčka, pravdepodobne predstavujú znečistenie genómovou DNA.

Plazmid pDEST15- Δ 40p53 α v 2. štarte poskytuje intenzívny bend pri 8 kbp, čo je približne dvojnásobná veľkosť oproti ostatným plazmidom. Mohlo by to naznačovať vznik diméru. Tento bend sa však nachádza približne v oblasti oc-DNA ostatných vzoriek. Je preto možné, že došlo ku zrušeniu superhelikálnej štruktúry a plazmid sa vo vzorke nachádza v otvorenej kruhovej forme.

3.4.1 Reštrikčné testy

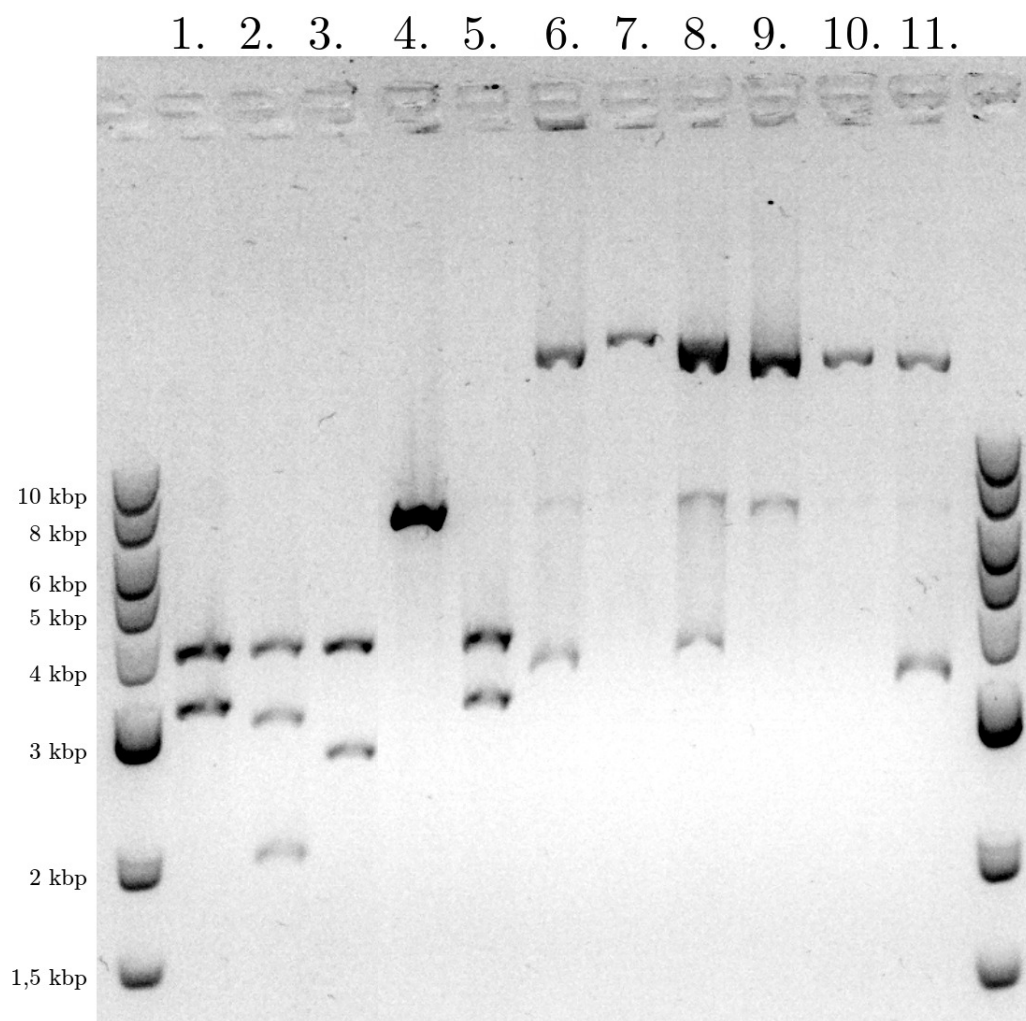
Štiepenie enzýmom *PvuII*

Enzým *PvuII* štiepi expresné vektory v dvoch oblastiach. Prvé reštrikčné miesto kóduje proteín *rop*, ktorý je prítomný vo všetkých pripravených vektoroch, pretože pochádza z pôvodného skeletu. Druhé štiepne miesto sa nachádza v časti domény proteínu p53, ktorá špecificky viaže DNA, to znamená v oblasti inzertu. Na rozdiel od izoform p53 α a p53 β majú izoformy p53 γ chýbajúcu presne tú časť DBD, v ktorej sa nachádza sekvencia pre pôsobenie endonukleázy *PvuII*. Preto by mali byť všetky expresné vektory izoform $\Delta 160\text{p53}$ enzýmom *PvuII* iba linearizované a poskytovať tak na géli iba jeden bend.

Konstruktory p53 α , $\Delta 133\text{p53}\alpha$, $\Delta 160\text{p53}\alpha$ a p53 β , ktoré sa nachádzajú v štartoch 1., 3., 4. a 5. odpovedajú predpokladanej schéme štiepenia. Vzorky 6.-11. sú znečistené genómovou DNA, ktorá sa nachádza nad rebríčkum. Ostatné vzorky nie sú naštiepené podľa očakávanej schémy, ich správnosť je teda otázná. $\Delta 40\text{p53}\alpha$, ktorá sa javila už pri predošlých géloch väčšia ako bolo predpokladané, sa štiepi na dva bendy ako bolo očakávané, obsahuje však naviac fragment o veľkosti viac ako 2 kbp. Správnosť všetkých vzoriek bola definitívne overená pri sekvenácii DNA.

Tabuľka 3.5: Veľkosti destinačných vektorov a ich fragmentov po štiepení endonukleázami

pDEST15-N6xHIS-GST-GW		Štiepenie <i>PvuII</i>		Veľkosť vektora
		Veľkosť [kbp]		[kbp]
1.	p53 α	3,60	3,01	6,610
2.	Δ 40p53 α	3,60	2,89	6,493
3.	Δ 133p53 α	3,60	2,61	6,214
4.	Δ 160p53 α	6,13		6,133
5.	p53 β	3,45	3,01	6,454
6.	Δ 40p53 β	3,45	2,89	6,337
7.	Δ 160p53 β	5,97		5,977
8.	p53 γ	3,46	3,01	6,469
9.	Δ 40p53 γ	3,46	2,89	6,352
10.	Δ 133p53 γ	3,46	2,61	6,073
11.	Δ 160p53 γ	5,99		5,992



Obr. 3.2: Štiepenie expresných vektorov enzýmom *PvuII*

3.4.2 Overenie expresných vektorov sekvenáciou

Sekvencie jednotlivých konštruktov získané Sangerovou sekvenáciou boli porovnané s expresnými vektormi vytvorenými v programe Benchling a na základe ich homológie v oblastiach nasadajúcich primerov boli vynesené závery zhrnuté v Tabuľke 3.6. Konštrukty pDEST15- p53 α , Δ 133p53 α a Δ 160p53 α boli potvrdené ako správne sekvenáciou aj analýzou prostredníctvom gélovej elektroforézy. Konštrukt pDEST15-p53 β sa na géloch javil ako správny, sekvenácia však odhalila chýbajúcich 33 bp na 3' konci. Rovnaký výsledok bol obdržaný aj pri sekvenácii pDEST15- Δ 160p53 β . Napriek tomu, že v reštrikčnom teste enzýmom *PvuII* plazmidy pDEST15-p53 γ a Δ 160p53 γ neposkytli očakávané bendy, Sangerova sekvenácia označila ich konštrukty za správne z koncov 5' aj 3'. Sekvenácia izoforiem Δ 40p53 β aj Δ 40p53 γ bola neúspešná a je potrebné ich zopakovať. pDEST15- Δ 40p53 α a Δ 133p53 γ sú správne na 3' konci, ale neboli úspešne osekvenované od 5' konca, takže je tiež potrebné ich sekvenáciu zopakovať.

Tabuľka 3.6: Prehľad výsledkov sekvenácie jednotlivých pDEST15 s izoformami p53

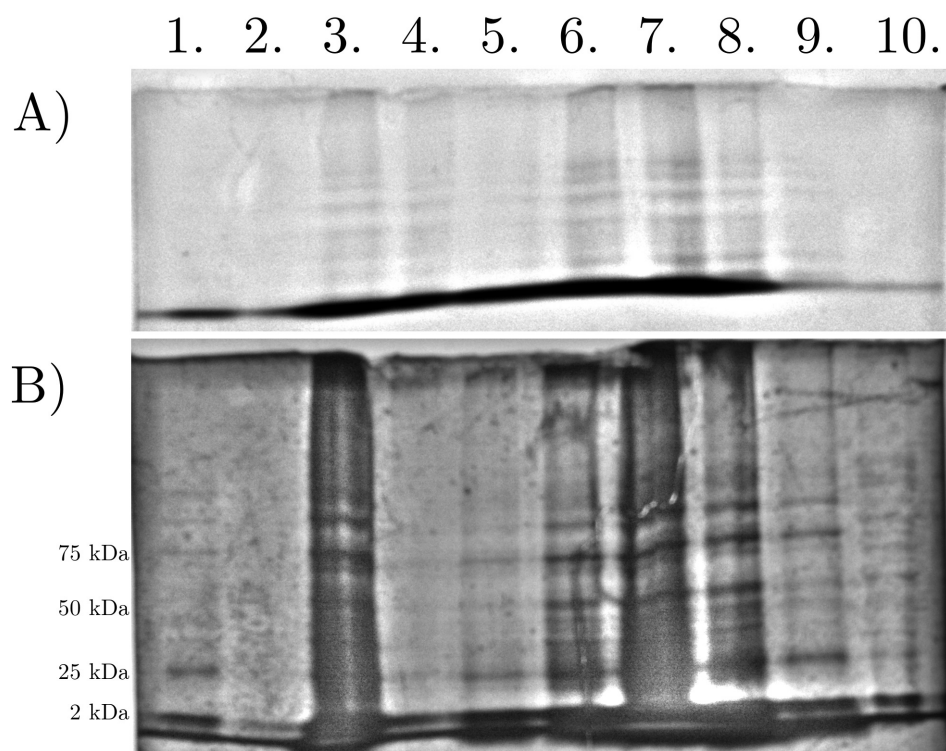
pDEST15-	Sekvencia na 5' konci	Sekvencia na 3' konci
p53 α	správna	správna
Δ 40p53 α	nie je k dispozícii	správna
Δ 133p53 α	správna	správna
Δ 160p53 α	správna	správna
p53 β	správna	chýba posledných 33 bp
Δ 40p53 β	neúspešná sekvenácia, krátke čítanie	
Δ 160p53 β	správna	chýba posledných 33 bp
p53 γ	správna	správna
Δ 40p53 γ	neúspešná sekvenácia, krátke čítanie	
Δ 133p53 γ	nie je k dispozícii	správna
Δ 160p53 γ	správna	správna

3.5 Izolácia proteínu

Bol izolovaný proteín Δ 160p53 γ , ktorého koncentrácie jednotlivých frakcií získaných počas izolácie sú uvedené v tabuľke 3.7. Veľkosť samotného proteínu Δ 160p53 γ je 26 kDa, ale keďže je exprimovaný spolu s GST tagom o veľkosti 26 kDa a HIS tagom o veľkosti 1 kDa, veľkosť exprimovaného fúzneho proteínu je 53 kDa. V prvom štarte sa nachádza proteínový rebríček. V druhom štarte sa nachádza kultúra pred indukciou a v treťom po indukcií. Ak by bola indukcia účinná, v oblasti 50 kDa by bol jasne viditeľný bend indikujúci nadmernú syntézu proteínu. V tabuľke 3.7 môžeme vidieť, že čistota 260/280 odpovedala prítomnosti proteínov v prípade dvoch vzoriek. Pri izolácii pomocou HIS tagu sa proteíny nachádzali v elúcii HE1 (štart 6.) a pri izolácii pomocou GST tagu v elúcii GE2 (štart 9.). V týchto štartoch bol očakávaný jeden intenzívny bend odpovedajúci veľkosti 53 kDa. Napriek tomu, že sú na géli viditeľné bendy v tejto oblasti, purifikácia nebola dostatočne účinná ani jednej izolácii a v elúcii sa nachádzajú aj proteíny inej veľkosti. Pre úspešnú izoláciu proteínov pomocou GST je potrebné, aby tento fúzny proteín nadobudol natívnu konformáciu, v ktorej sa viaže na glutatión [77]. Je tiež nevyhnutné dbať na to, aby bola elúcia proteínu vykonaná použitím čerstvého roztoku glutatiónu v redukovanom stave, pretože rozpustený vo vode rýchlo dimerizuje. [68] V prípade použitia starého roztoku glutatiónu nemusí dôjsť ku elúcii naviazaného proteínu vôbec. Roztok glutatiónu, ktorý bol použitý na elúciu, bol pravdepodobne čiastočne dimerizovaný. Napriek tomu, že izolácia a separácia proteínu Δ 160p53 γ bola vykonaná niekoľkokrát, na dosiahnutie požadovanej čistoty a vysokej koncentrácie izolovaného proteínu je v budúcnosti potrebné optimalizovať postup izolácie proteínu aj SDS-PAGE. V predošlých výskumoch bola pozorovaná nižšia výťažnosť proteínov prostredníctvom GST fúzneho proteínu ako prostredníctvom HIS kotvy. Tento rozdiel výťažnosti je pravdepodobne spôsobený neúplnou elúciou proteínu naviazaného na agarózu cez GST [70]. V našom prípade bola tiež nameraná niekoľkonásobne vyššia koncentrácia proteínov izolovaných prostredníctvom HIS tagu. K zvýšeniu koncentrácie proteínov izolovaných prostredníctvom GST tagu by však mohlo dôjsť v prípade použitia čerstvo pripraveného roztoku glutatiónu.

Tabuľka 3.7: Analýza proteínu $\Delta 160p53\gamma$ a jeho frakcií pomocou PAGE-SDS.

Č. štartu	Vzorka	c [ng/ μ l]	260/280
1.	Proteínový rebríček	-	-
2.	K1 kultúra pred indukciou	-	-
3.	K2 kultúra po indukci	-	-
4.	K3 pretečený lyzát	2,397	0,76
5.	K4 premývací pufor	0,147	1,96
6.	HE1 prvá elúcia pomocou HIS tagu	1,782	0,74
7.	HE2 druhá elúcia pomocou HIS tagu	0,303	1,42
8.	GE1 prvá elúcia pomocou GST tagu	-0,104	5,74
9.	GE2 druhá elúcia pomocou GST tagu	0,113	0,57
10.	GE3 tretia elúcia pomocou GST tagu	0,013	2,02

**Obr. 3.3:** Analýza proteínu $\Delta 160p53\gamma$ a jeho frakcií pomocou PAGE-SDS.

Vrchný gél bol farbený Coomassie blue a spodný striebrom.

4. ZÁVER

V teoretickej časti diplomovej práce je pojednávané o proteíne p53, jeho izoformách, štruktúre, funkcii a regulácii. Je vysvetlený princíp Gateway klonovania a sú zhrnuté základné princípy izolácie DNA a proteínov pomocou HIS a GST značenia.

V experimentálnej časti boli LR reakciou, ktorá funguje na princípe homológnej rekombinácie medzi *att* miestami, pripravené expresné vektory. Entry klony obsahujúce izoformy proteínu p53 v konštrukte pENTR221 boli rekombinované s destinačným vektorom pDEST155-N6xHis-GST-GW-DEST. Výsledkom boli expresné vektory kódujúce za silným indukibilným promótorom T7 okrem izoformiemi proteínu p53 aj HIS a GST kotvy pre ich následnú purifikáciu.

Na uskutočnenie LR reakcie bolo potrebné izolovať pDNA o dostatočnej koncentrácii. Tá bola dosiahnutá po transformácii Entry klonov do čerstvých buniek kmeňa Stbl3 a po vynechaní kroku premývania pufrom PW1. Pri izolácii destinačného vektora bol dokázaný vplyv teploty elučného roztoku na kvalitu elúcie DNA zo silikagélovej náplne. Oproti elúcii pri laboratórnej teplote sa koncentrácia DNA po 30 minútovej inkubácii elučného pufru na kolóne zvýšila z priemerných 20 ± 4 ng/ μ l na 60 ± 15 ng/ μ l.

Úspešne rekombinovaných bolo 11 izoformiemi proteínu p53, expresný vektor pDEST15- Δ 133p53 β sa nepodarilo pripraviť ani po niekoľkých opakovaníach. Správnosť vzniknutých expresných vektorov bola overená Sangerovou metódou sekvenácie. V piatich konštruktoch (pDEST15- p53 α , Δ 133p53 α , Δ 160p53 α , p53 γ a Δ 160p53 γ) bola správnosť inzertov potvrdená na 5' aj 3' konci. Kvôli krátkemu čítaniu alebo neúspešnej amplifikácii jedného z koncov je sekvenáciu potrebné zopakovať v prípade p53 β , Δ 40p53 γ a Δ 133p53 γ . Ak by po sekvenácii boli sekvenované izoformy označené ako nesprávne, je potrebné izolovať viac kolónií transformantov po LR reakcii a znova ich otestovať reštrikčnými testami alebo sekvenáciou. Ak by sekvenácia znova vyvrátila správnosť konštruktov, bolo by nevyhnutné zopakovať LR reakciu. V prípade konštruktov pDEST15- p53 β a Δ 160p53 β boli inzerty sekvenáciou identifikované ako o 33 párov báz skrátené na 3' konci a je potrebné podrobiť ich novej rekombinácii. Pred zopakovaním LR reakcie je však vhodné reštrikčnými testami alebo sekvenáciou otestovať vstupné Entry klony nesúce sekvencie týchto izoformiemi. V konštrukte pDEST15- Δ 40p53 α bola reštrikčnými testami dokázaná prítomnosť cudzorodého fragmentu, preto je na získanie správneho expresného klonu nesúceho túto izoformu potrebné zopakovať LR reakciu.

Pri izolácii proteínu Δ 160p53 γ prostredníctvom GST značky bola koncentrácia izolovaného proteínu nižšia ako pri izolácii cez HIS značku. Na dosiahnutie požadovanej čistoty a vysokej koncentrácie izolovaného proteínu je v potrebné optimalizovať postup izolácie proteínu a SDS-PAGE.

LITERATÚRA

- [1] MACHADO-SILVA, Alice, Stéphane PERRIER a Jean-Christophe BOURDON, 2010. P53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, **20**(1), 57-62. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.02.005.
- [2] JAGELSKÁ, Eva B., Hana PIVOŇKOVÁ, Miroslav FOJTA a Václav BRÁZDA, 2010. The potential of the cruciform structure formation as an important factor influencing p53 sequence-specific binding to natural DNA targets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, **391**(3), 1409-1414. DOI: 10.1016/J.BBRC.2009.12.076.
- [3] KAMADA, Rui, Yu TOGUCHI, Takao NOMURA, Toshiaki IMAGAWA a Kazuyasu SAKAGUCHI, 2016. Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications. *Biopolymers*. John Wiley & Sons, **106**(4), 598-612. DOI: 10.1002/bip.22772.
- [4] KNEZOVIĆ FLORIJEAN, Marijana, Petar OZRETIĆ, Maro BUJAK, Laura PEZZÈ, Yari CIRIBILLI, Željko KAŠTELAN, Neda SLADE a Tvrtko HUDOLIN, 2019. The role of p53 isoforms' expression and p53 mutation status in renal cell cancer prognosis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier. DOI: 10.1016/J.UROLONC.2019.03.007.
- [5] INGARAMO, María Clara, Juan A. SÁNCHEZ a Andrés DEKANTY, 2018. Regulation and function of p53: A perspective from Drosophila studies. *Mechanisms of Development*. Elsevier, **154**, 82-90. DOI: 10.1016/J.MOD.2018.05.007.
- [6] HELLWEG, Christine E., Luis F. SPITTA, Bernd HENSCHENMACHER, Sebastian DIEGELER a Christa BAUMSTARK-KHAN, 2016. Transcription Factors in the Cellular Response to Charged Particle Exposure. *Frontiers in Oncology*. Frontiers, **6**, 61-61. DOI: 10.3389/fonc.2016.00061.
- [7] NIAZI, Sarfaraj, Madhusudan PUROHIT a Javed H. NIAZI, 2018. Role of p53 circuitry in tumorigenesis: A brief review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson, **158**, 7-24. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2018.08.099.
- [8] LABUSCHAGNE, Christiaan F., Fabio ZANI a Karen H. VOUSDEN, 2018. Control of metabolism by p53 – Cancer and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. Elsevier, **1870**(1), 32-42. DOI: 10.1016/J.BBCAN.2018.06.001.
- [9] VIELER, Maximilian a Suparna SANYAL, 2018. P53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, **10**(9). DOI: 10.3390/cancers10090288.

- [10] KIM, SeJin a Seong Soo A AN, 2016. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine. Wolters Kluwer Health*, **95**(26), e3993-e3993. DOI: 10.1097/MD.0000000000003993.
- [11] JORUIZ, Sebastien M a Jean-Christophe BOURDON, 2016. P53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision.: Key Regulators of the Cell Fate Decision. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6(8). DOI: 10.1101/cshperspect.a026039.
- [12] BOURDON, Jean-Christophe, Kenneth FERNANDES, Fiona MURRAY-ZMIJEWSKI, Geng LIU, Alexandra DIOT, Dimitris P XIRODIMAS, Mark K SAVILLE a David P LANE, 2005. P53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **19**(18), 2122-37. DOI: 10.1101/gad.1339905.
- [13] WEI, Jinxiong, Elena ZAIKA a Alexander ZAIKA, 2012. P53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *Journal of nucleic acids*. Hindawi Limited, **2012**. DOI: 10.1155/2012/687359.
- [14] SOUSSI, Thierry, 2010. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. EMBO reports. *European Molecular Biology Organization*, **11**(11), 822-6. DOI: 10.1038/embo.2010.159.
- [15] KHOURY, Marie P. a Jean-Christophe BOURDON, 2010. The isoforms of the p53 protein. Cold Spring Harbor perspectives in biology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2**(3), a000927-a000927. DOI: 10.1101/cshperspect.a000927.
- [16] CHEN, Yongheng, Raja DEY a Lin CHEN, 2010. Crystal structure of the p53 core domain bound to a full consensus site as a self-assembled tetramer. *Structure*. NIH Public Access, **18**(2), 246-56. DOI: 10.1016/j.str.2009.11.011.
- [17] HARMS, K L a X CHEN, 2006. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death and Differentiation*. **13**, 890-897. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401904.
- [18] BRÁZDA, Václav a Jan COUFAL, 2017. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(2), DOI: 10.3390/ijms18020375.
- [19] CHILLEMI, Giovanni, Sebastian KEHRLOESSER, Francesca BERNASSOLA, Alessandro DESIDERI, Volker DÖTSCH, Arnold J LEVINE a Gerry MELINO, 2017. Structural Evolution and Dynamics of the p53 Proteins. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **7**(4). DOI: 10.1101/cshperspect.a028308.
- [20] ANG, Shaomeng, Yujun ZHAO, Angelo AGUILAR, Denzil BERNARD a Chao-Yie YANG, 2017. Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **7**(5), a026245-a026245. DOI: 10.1101/cshperspect.a026245.

- [21] FERNANDEZ-FERNANDEZ, M. R. a B. SOT, 2011. The relevance of protein-protein interactions for p53 function: the CPE contribution: the CPE contribution. *Protein Engineering Design and Selection*. Narnia, **24**(1-2), 41-51. DOI: 10.1093/protein/gzq074.
- [22] BOLDRUP, Linda, Jean Christophe BOURDON, Philip J. COATES, Björn SJÖSTRÖM a Karin NYLANDER, 2007. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *European Journal of Cancer*. Europe PMC Funders, **43**(3), 617-623. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.10.019.
- [23] JOST, Christine A., Maria C. MARIN a William G. Kaelin JR., 1997. P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. Nature Publishing Group, **389**(6647), 191-194. DOI: 10.1038/38298.
- [24] Responzivní element. *Velký lékařský slovník On-Line*, [online]. [cit. 2019-04-18]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/responzivni-element>
- [25] KIM, Chongwoo A. a James U. BOWIE, 2003. SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends in Biochemical Sciences*. **28**(12), 625-628. DOI: 10.1016/j.tibs.2003.11.001. Dostupné tiež z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659692>
- [26] VAN NOSTRAND, Jeanine L, Margot E BOWEN, Hannes VOGEL, Maria BARNA a Laura D ATTARDI, 2017. The p53 family members have distinct roles during mammalian embryonic development. *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, **24**(4), 575-579. DOI: 10.1038/cdd.2016.128.
- [27] MARCEL, V. a P. HAINAUT, 2009. P53 isoforms - A conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity?. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **66**(3), 391-406. DOI: 10.1007/s00018-008-8336-3.
- [28] DÖTSCH, V, F BERNASSOLA, D COUTANDIN, E CANDI a G MELINO, 2010. P63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2**(9), a004887-a004887. DOI: 10.1101/cshperspect.a004887.
- [29] KOVACS, Erika, Peter TOMPA, Karoly LILIOM a Lajos KALMAR, 2010. Dual coding in alternative reading frames correlates with intrinsic protein disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, **107**(12), 5429-34. DOI: 10.1073/pnas.0907841107.
- [30] BAZRAFSANI, Mohammad Reza R., Pouriaali A. NOWSHADI, Sadegh SHIRIAN, et al., 2016. Deletion/duplication mutation screening of TP53 gene in patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cancer Medicine*. John Wiley & Sons, **5**(2), 145-152. DOI: 10.1002/cam4.561.
- [31] CAMMACK, Richard, 2006. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, ISBN 9780191727641.

- [32] MARCEL, Virginie, Stéphane PERRIER, Mustapha AOUBALA, et al., 2010. $\Delta 160p53$ is a novel N-terminal p53 isoform encoded by $\Delta 133p53$ transcript. *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier, **584**(21), 4463-4468. DOI: 10.1016/J.FEBSLET.2010.10.005.
- [33] BOURDON, Jean-Christophe, 2007. P53 Family isoforms. Current pharmaceutical biotechnology. *Europe PMC Funders*, **8**(6), 332-6.
- [34] COURTOIS, Stéphanie, Gerald VERHAEGH, Sophie NORTH, Maria-Gloria LUCIANI, Patrice LASSUS, Ula HIBNER, Moshe OREN a Pierre HAINAUT, 2002. ΔN -p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene*. Nature Publishing Group, **21**(44), 6722-6728. DOI: 10.1038/sj.onc.1205874.
- [35] LUO, Zhenghua, Ri CUI, Esmerina TILI a Carlo CROCE, 2018. Friend or Foe: MicroRNAs in the p53 network: MicroRNAs in the p53 network. *Cancer Letters*. Elsevier, **419**, 96-102. DOI: 10.1016/J.CANLET.2018.01.013.
- [36] CHEN, Jiandong, 2016. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **6**(3), a026104-a026104. DOI: 10.1101/cshperspect.a026104.
- [37] WANG, David B., Chizuru KINOSHITA, Yoshito KINOSHITA a Richard S. MORRISON, 2014. P53 and mitochondrial function in neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, **1842**(8), 1186-1197. DOI: 10.1016/J.BBADIS.2013.12.015.
- [38] O'BRATE, Aurora a Paraskevi GIANNAKAKOU, 2003. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?: nuclear or cytoplasmic zip code?. *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone, **6**(6), 313-322. DOI: 10.1016/J.DRUP.2003.10.004.
- [39] DUFFY, Michael J., Naoise C. SYNNOTT a John CROWN, 2017. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *European Journal of Cancer*. Pergamon, **83**, 258-265. DOI: 10.1016/J.EJCA.2017.06.023.
- [40] GOODSELL, D.S., 2002. P53 Tumor Suppressor. RCSB Protein Data Bank. DOI: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2002_7.
- [41] BRÁZDA, Václav a Jan COUFAL, 2017. Recognition of Local DNA Structures by p53 Protein. *International Journal of Molecular Sciences*. **18**(2), 375-375. DOI: 10.3390/ijms18020375.
- [42] WALTER, Korden, Gabriele WARNECKE, Richard BOWATER, Wolfgang DEPPERT a Ella KIM, 2005. Tumor suppressor p53 binds with high affinity to CTG.CAG trinucleotide repeats and induces topological alterations in mismatched duplexes. *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, **280**(52), 42497-507. DOI: 10.1074/jbc.M507038200.

- [43] YUE, Xuétian, Yuhan ZHAO, Yang XU, Min ZHENG, Zhaohui FENG a Wenwei HU, 2017. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 429(11), 1595-1606. DOI: 10.1016/J.JMB.2017.03.030.
- [44] MURCHIE, Alastair I.H. a David M.J. LILLEY, 1987. The mechanism of cruciform formation in supercoiled DNA: initial opening of central basepairs in salt-dependent extrusion. *Nucleic Acids Research*. **15**(23), 9641-9654. DOI: 10.1093/nar/15.23.9641. ISSN 0305-1048.
- [45] BOURDON, J-C, 2007. P53 and its isoforms in cancer. *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, **97**(3), 277-282. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603886.
- [46] BOURDON, Jean-Christophe, Marie P KHOURY, Alexandra DIOT, et al., 2011. P53 mutant breast cancer patients expressing p53 have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast cancer research: BCR*. BioMed Central, **13**(1), R7-R7. DOI: 10.1186/bcr2811.
- [47] SONG, Wei, Shi-wei HUO, Jia-ju LÜ, Zheng LIU, Xiao-lei FANG, Xun-bo JIN a Ming-zhen YUAN, 2009. *Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma*. Chinese medical journal. **122**(8), 921-6.
- [48] BIOLABS, New England, 2018. Molecular Cloning. [online]. [2019-04-03]. Dostupné z: www.neb.com/-/media/nebus/files/brochures/cloning_tech_guide.pdf
- [49] WINGFIELD, Paul T, 2015. Overview of the purification of recombinant proteins. Current protocols in protein science. *Current Protocols Protein Science*. NIH Public Access, **80**, DOI: 10.1002/0471140864.ps0601s80.
- [50] GATEWAY™ Cloning Technology, [online]. [2019-04-08]. Dostupné tiež z: www.lifetech.com/gateway
- [51] HARTLEY, J L, G F TEMPLE a M A BRASCH, 2000. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **10**(11), 1788-95. DOI: 10.1101/GR.143000.
- [52] Europaeen Molecular Biology Laboratory. Cloning Methods, recombination cloning systems - GATEWAY Cloning Technology, [online]. [cit. 2019-04-08]. Dostupné z: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/recombination/gateway/
- [53] BERNARD, Philippe, 1996. Positive Selection of Recombinant DNA by *CcdB*. *BioTechniques*. **21**(2), 320-323. DOI: 10.2144/96212pf01.
- [54] REECE, Richard J. a Anthony MAXWELL, 1991. DNA Gyrase: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **26**(3-4), 335-375. DOI: 10.3109/10409239109114072.

- [55] DUGATKIN, Lee Alan, Michael PERLIN, J. Scott LUCAS a Ronald ATLAS, 2005. Group-beneficial traits, frequency-dependent selection and genotypic diversity: an antibiotic resistance paradigm. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **272**(1558), 79-83. DOI: 10.1098/rspb.2004.2916.
- [56] PERLIN, Michael H., Denise R. CLARK, Courtney MCKENZIE, et al., 2009. Protection of *Salmonella* by ampicillin-resistant *Escherichia coli* in the presence of otherwise lethal drug concentrations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **276**(1674), 3759-3768. DOI: 10.1098/rspb.2009.0997.
- [57] Registry of Standard Biological Parts. T7.
- [58] LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, Invitrogen, 2012. User guide *E. coli* Expression System with Gateway® Technology. DOI: 25-0517 MAN0000278. [online]. [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/ecoli_gateway_man.pdf
- [59] PRNOBIS, Mira I, Natalie DEUTCH a Mark PEIFER, 2016. The Miraprep: A Protocol that Uses a Miniprep Kit and Provides Maxiprep Yields.: A Protocol that Uses a Miniprep Kit and Provides Maxiprep Yields. *PloS one*. Public Library of Science, **11**(8), e0160509-e0160509. DOI: 10.1371/journal.pone.0160509.
- [60] SCIENTIFIC, Thermo Fisher, 2009. T042-Technical bulletin NanoDrop Spectrophotometers. [online]. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: www.nanodrop.com
- [61] Electrophoresis. Simple cloning lab. [online]. [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <http://www.bioinformatics.nl/molbi/SimpleCloningLab/electrophoresis.htm>
- [62] SPRIESTERSBACH, Anne, Jan KUBICEK, Frank SCHÄFER, Helena BLOCK a Barbara MAERTENS, 2015. Purification of His-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology*. Academic Press, **559**, 1-15. DOI: 10.1016/BS.MIE.2014.11.003. ISBN 9780128002797.
- [63] URH, Marjeta, Dan SIMPSON a Kate ZHAO, 2009. Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods: General Methods. *Methods in Enzymology*. Academic Press, **463**, 417-438. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63026-3. ISBN 9780123745361.
- [64] ROSSMANN, M. G. a P. ARGOS, 1981. Protein Folding. *Annual Review of Biochemistry*. **50**(1), 497-532. DOI: 10.1146/annurev.bi.50.070181.002433. ISSN 0066-4154.
- [65] KIMPLE, Michelle E, Allison L BRILL a Renee L PASKER, 2013. Overview of affinity tags for protein purification. *Current protocols in protein science*. NIH Public Access, **73**, Unit 9.9-Unit 9.9. DOI: 10.1002/0471140864.ps0909s73.
- [66] Glutathione. National cancer insitute. [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns = NCI_Thesaurus&code = C523
- [67] HARPER, Sandra a David W SPEICHER, 2011. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. NIH Public Access, **681**, 259-80. DOI: 10.1007/978-1-60761-913-0_14.

- [68] YAMAMOTO, Toshio a Kazuoki ISHIHARA, 1994. Stability of Glutathione in Solution. *Developments in Food Engineering*. Boston, MA: Springer US, 1994, 209-211. DOI: 10.1007/978-1-4615-2674-2_62. ISBN 978-1-4613-6149-7.
- [69] JEON, Che Ok a Baolei JIA, 2016. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspective. *Open biology*. **6**. DOI: 10.1098/rsob.160196.
- [70] SCHEICH, Christoph, Volker SIEVERT a Konrad BÜSSOW, 2003. An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *BMC Biotechnology*. BioMed Central, **3**(1), DOI: 10.1186/1472-6750-3-12.
- [71] Gateway LR Clonase II Enzyme Mix. Thermo Fisher Scientific. [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/lr_clonaseii_man.pdf
- [72] Plasmid DNA purification User manual. Macherey-Nagel. [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: www.mn-net.com
- [73] Nucleic Acid Isolation Guide. Bioline. [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: www.bioline.com
- [74] VANDEVENTER, Peter E., Jorge MEJIA, Ali NADIM, Malkiat S. JOHAL a Angelika NIEMZ, 2013. DNA Adsorption to and Elution from Silica Surfaces: Influence of Amino Acid Buffers. *The Journal of Physical Chemistry B*. **117**(37), 10742-10749. DOI: 10.1021/jp405753m. ISSN 1520-6106.
- [75] HUANG, Mo Chao, Hongye YE, Yoke Kong KUAN, Mo-Huang LI a Jackie Y. YING, 2009. Integrated two-step gene synthesis in a microfluidic device. *Lab Chip*. **9**(2), 276-285. DOI: 10.1039/B807688J. ISSN 1473-0197.
- [76] One Shot Stbl3 Chemically Competent *E. coli*. Thermo Fisher Scientific. [online]. [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C737303>
- [77] BARRON, Lindsey, Alexander J. R. BISHOP, 2018. P53 and HIS-tag Binding. *Journal of Proteomics Bioinformatics*. **11**(3), 1-6. DOI: 10.4172/jpb.1000467. ISSN 0974276X

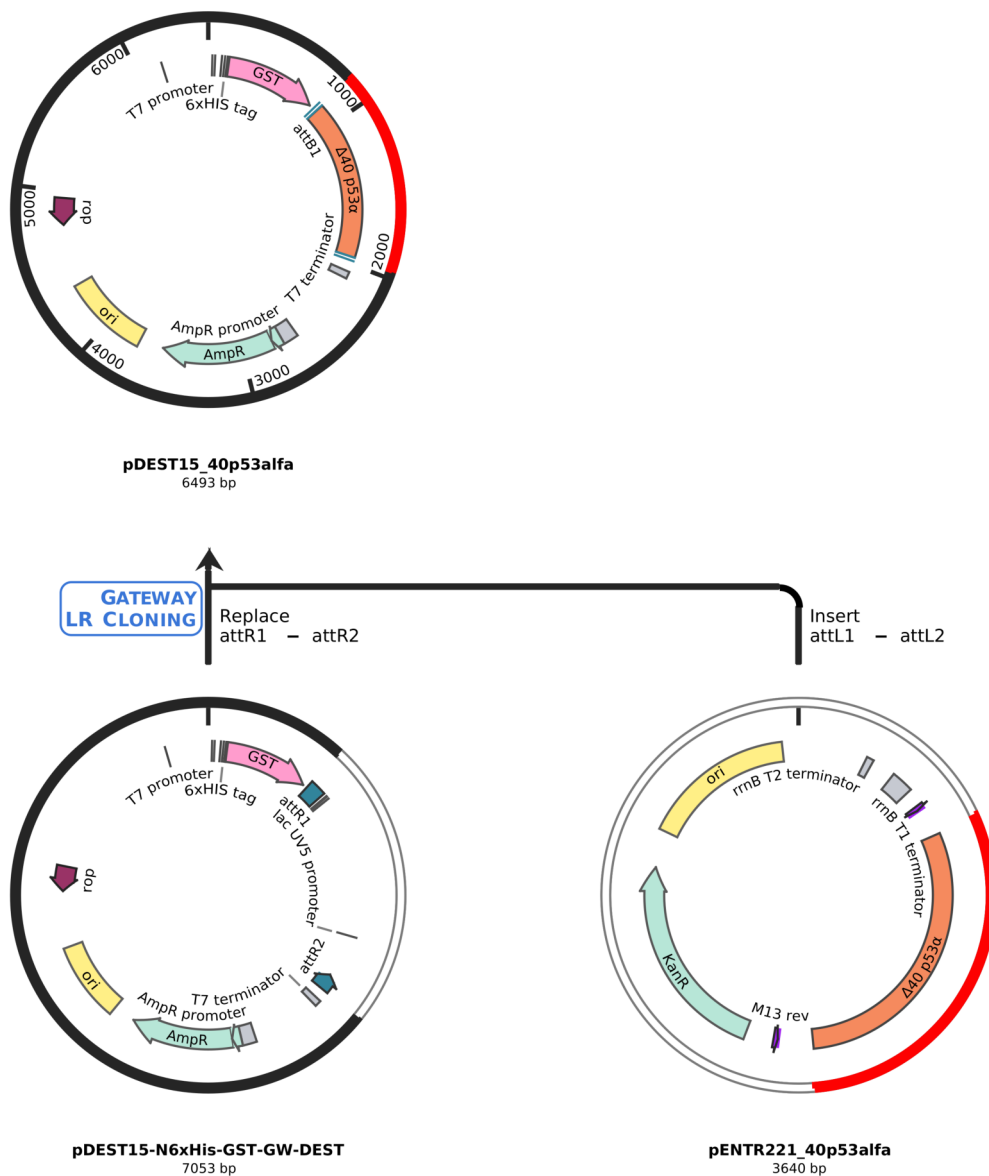
5. ZOZNAM SKRATIEK

- A – adenín
- Ap^R – rezistencia voči ampicilínu
- C – cytozín
- cAMP – cyklický adenosínmonofosfát
- CAP – katabolický aktivačný proteín
- ccc-DNA – superhelikálna DNA
- Cdk – cyklín dependentná kináza
- Cm^R – rezistencia voči chloramfenikolu
- CTD – karboxy-terminálna doména
- DBD – doména, ktorá sa viaže na deoxyribonukleovú kyselinu
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- FLp53 – proteín p53 v plnej dĺžke (označovaný tiež ako p53 α)
- G – guanín
- G1 – fáza rastu buniek v bunkovom cykle
- GST – glutatión-S-transferáza
- HD – flexibilná doména
- HIS – polyhistidínová značka
- IHF – integračný hostiteľský faktor
- IPTG – izopropyl- β -D-1-tiogalaktopyranozid
- IRES – vnútorné miesto pre vstup ribozómu
- kbp – kilo párov báz
- kDa – kilodalton
- Km^R – rezistencia voči kanamycínu
- LA – médium Luria-Bertani s agarom
- LB – médium Luria-Bertani
- Km^R – rezistencia voči kanamycínu
- MDM2 – enzým ubikvitín ligáza; z anglického „Mouse Double Minute 2 Homolog“
- l-DNA – lineárna deoxyribonukleová kyselina
- miRNA – mikro ribonukleová kyselina
- mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina
- NES – jadrový exportný signál
- oc-DNA – otvorená kruhová deoxyribonukleová kyselina
- OD – oligomerizačná doména
- OD₂₆₀ – optická hustota pri 260 nanometroch
- P1 – promótor 1
- P2 – promótor 2
- pDNA – plazmidová deoxyribonukleová kyselina
- PRD – doména bohatá na prolín
- Pu – purín
- Py – pyrimidín

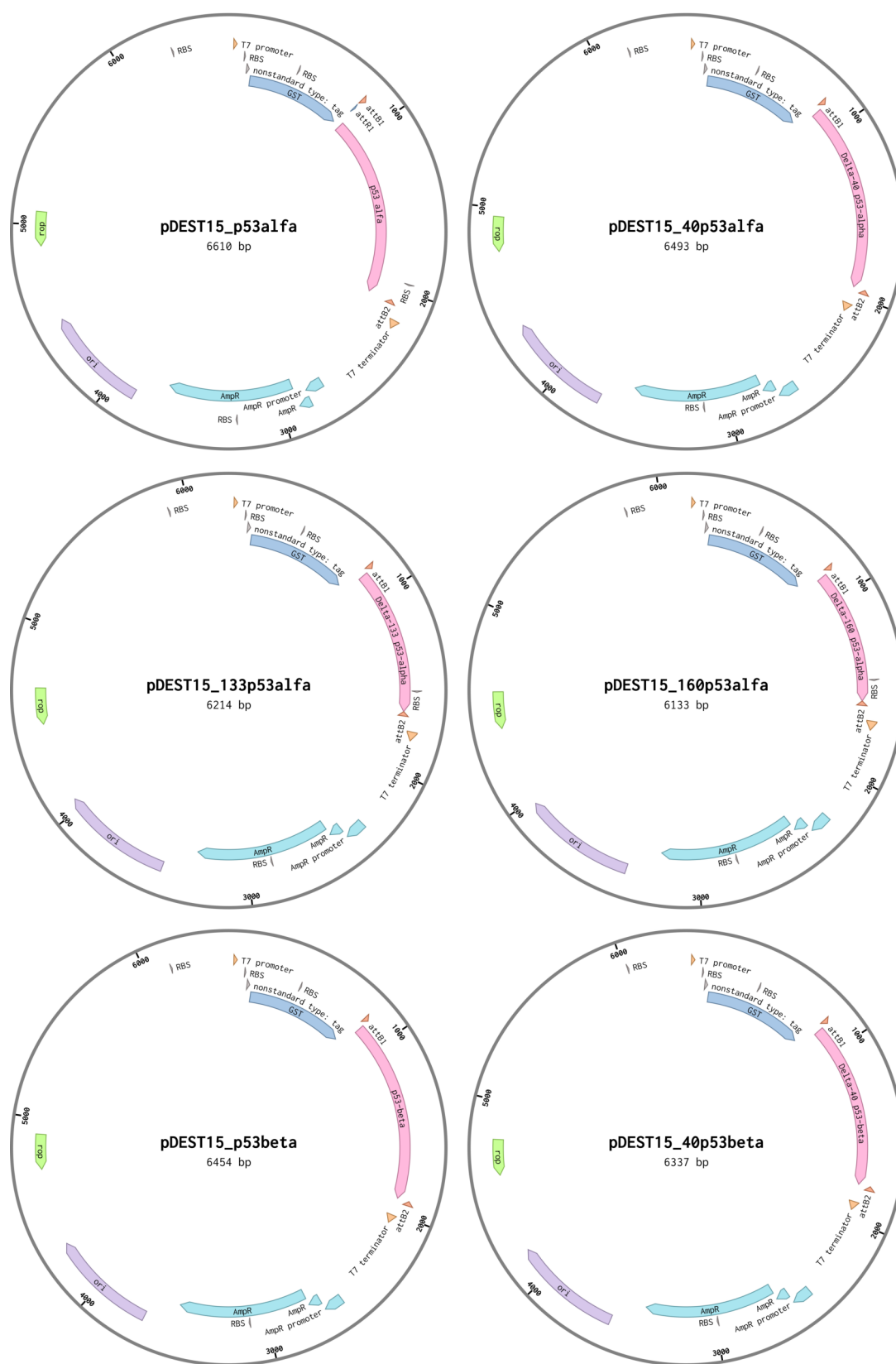
- RE – responzívny element
- RNA – ribonukleová kyselina
- S – syntetická fáza bunkového cyklu
- SAM – doména; z anglického „sterile alpha motif”
- SDS-PAGE – polyakrylamidová gélová elektroforéza v prítomnosti sodium dodecyl sulfátu
- T – tymín
- TAD – transaktivačná doména
- WTP53 – divoký typ, nemutovaná forma proteínu p53
- *Xis* – enzým excisionáza

6. PRÍLOHY

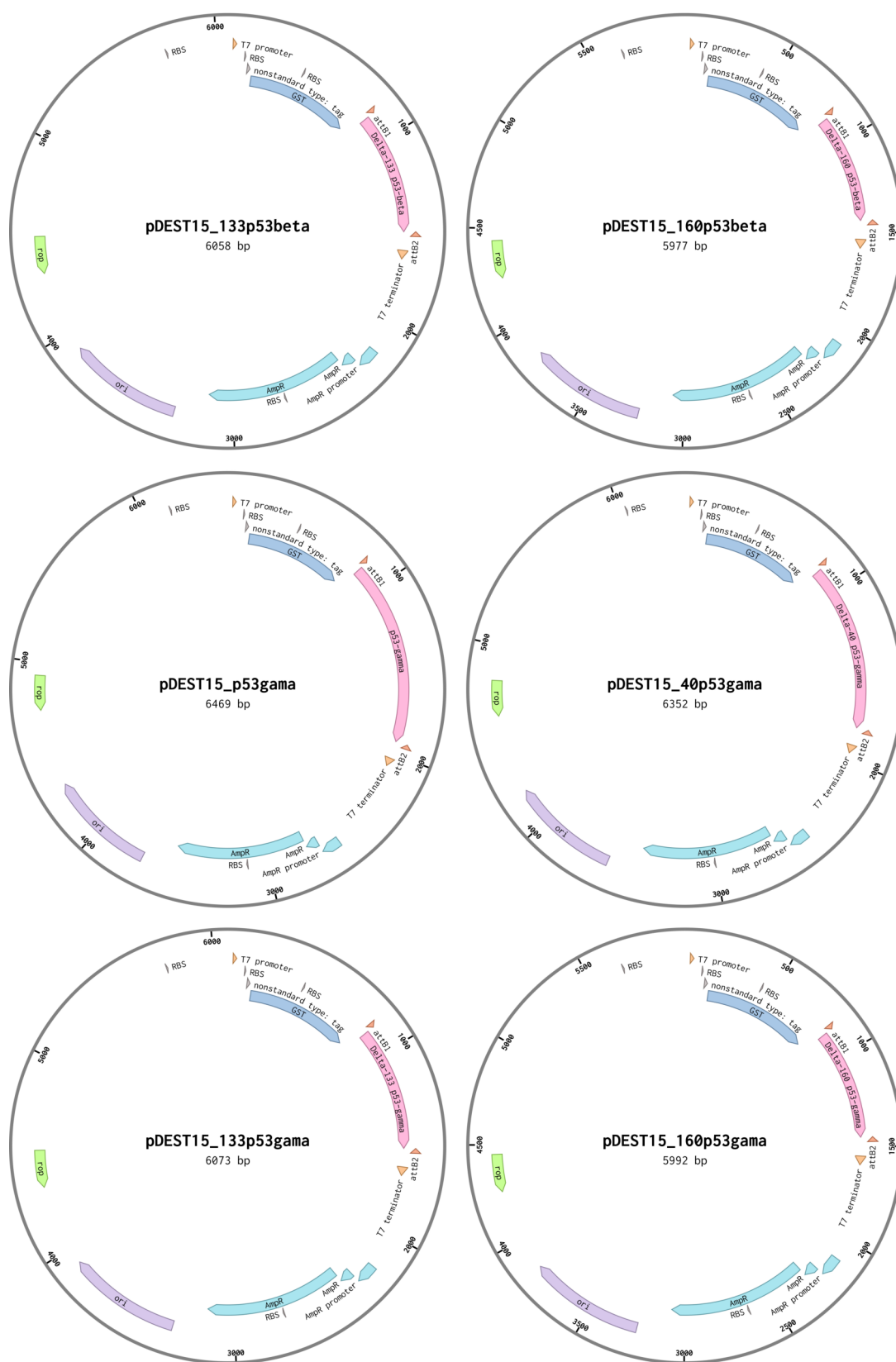
Schématické zobrazenie LR reakcie a plazmidové mapy expresných vektorov



Obr. 6.1: Príklad schématického zobrazenia LR reakcie pre p53α vytvorený použitím programu SnapGene.



Obr. 6.2: 1. Plazmidové mapy konštruktov pDEST15 s jednotlivými izoformami p53 vytvorené použitím programu Benchling.



Obr. 6.3: 2. Plazmidové mapy konštruktov pDEST15 s jednotlivými izoformami p53 vytvorené použitím programu Benchling.